


 <p>UFAL</p>	<p>Universidade Federal de Alagoas Instituto de Química e Biotecnologia-IQB</p> <p><i>Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia- PPGQB</i></p>	 <p>IQB</p>
---	---	--

EDJANE VIEIRA PIRES

**EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO FEROMÔNIO SEXUAL
DA BROCA DOS FRUTOS DA PINHA E DA GRAVIOLA, *CERCONOTA
ANONELLA* (SEPP., 1830) (LEPIDOPTERA: OECOPHORIDAE)**

Maceió - Alagoas

2013

 UFAL	<p>Universidade Federal de Alagoas Instituto de Química e Biotecnologia-IQB</p> <p><i>Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia- PPGQB</i></p>	 IQB
---	--	--

EDJANE VIEIRA PIRES

EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO FEROMÔNIO SEXUAL DA BROCA DOS FRUTOS DA PINHA E DA GRAVIOLA, *CERCONOTA ANONELLA* (SEPP., 1830) (LEPIDOPTERA: OECOPHORIDAE)

Tese apresentada ao Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para fins de obtenção de título de Doutorado em Química e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ruth Rufino do Nascimento

Maceió - Alagoas

2013

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

P667e Pires, Edjane Vieira.
Extração e identificação dos componentes do feromônio sexual de broca dos frutos da pinha e da graviola, *Cerconota anonella* (Sepp., 1830) (Lepidoptera: Oecophoridae) / Edjane Vieira Pires. – 2013. 85 f. : il.

Orientadora: Ruth Rufino do Nascimento.
Co-orientador: Antônio Euzébio Goullart Sant'Ana.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 68-85.

1. Feromônio sexual – Análise. 2. *Annona muricata*. 3. *Annona squamosa*. 4. *Cerconota*. I. Título.

CDU: 543.645.9:577.175.6



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **Edjane Vieira Pires**, intitulada: “**Extração e Identificação dos Componentes do Feromônio Sexual da Broca dos Frutos de Pinha e de Graviola *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Oecophoridae)**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 13 de maio de 2013, às 09:00, no auditório do Severinão/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Ruth Rufino do Nascimento
Ruth Rufino do Nascimento
Orientadora - PPGQB/IQB/UFAL

Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
Coorientador - PPGQB/IQB/UFAL

Aldenise Alves Moreira
Aldenise Alves Moreira
UESB

Adriana de Lima Mendonça
Adriana de Lima Mendonça
IQB/UFAL

Roseane Cristina Predes Trindade
Roseane Cristina Predes Trindade
CECA/UFAL

João Gomes da Costa
João Gomes da Costa
PPGQB/EMBRAPA

Dedico este trabalho aos meus pais que em todos os momentos da minha vida se fazem presentes, me apoiando e ajudando sempre que preciso. Eles são, sem dúvida, meus melhores amigos.

Ao meu amado esposo pelo carinho, companheirismo e compreensão de todos os dias.

Ao meu fruto mais abençoado: meu querido Nicolas.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao grande Deus que em
tudo me faz capaz.*

AGRADECIMENTOS

- Aos professores **Ruth Rufino do Nascimento, Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana**, pelo conhecimento transmitido, apoio, estímulo, paciência e orientação;
- Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de doutorado;
- Aos **professores** do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas pelos ensinamentos;
- Ao pesquisador e professor **João Gomes da Costa** pela competência e amizade;
- Aos companheiros de laboratórios e amigos da Universidade Federal de Alagoas, **Aldy, Ana Lucila, Andréa, Adriana, Carla, Cristhiane, Danielle, Daniel, Daiana, Emília, Joubert, Luciana, Mariana, Pedro, Rita, e todos**, que mesmo indiretamente, apoiaram e contribuíram e para minha formação;
- À **Cenira**, pela amizade verdadeira e apoio em todos os momentos deste trabalho.

RESUMO

Este estudo objetivou a extração, identificação e síntese dos componentes do feromônio sexual de *Cerconota anonella* (Sepp. 1830) (Lepidoptera: Oecophoridae), bem como avaliar a sua eficiência em ensaios conduzidos em condições de laboratório e de campo, visando o seu emprego, em médio prazo, no controle desta praga dentro do contexto de Manejo Integrado das Pragas de Annonaceae. Inicialmente, para escolher o solvente mais adequado para a extração dos componentes do feromônio sexual, experimentos foram conduzidos empregando-se hexano e diclorometano para lavagem da glândula abdominal de fêmeas de *C. anonella* em chamamento e com idade variando entre 2-3 dias. Estes extratos foram usados em bioensaios conduzidos em laboratório empregando machos coespecíficos com idade variando entre 2-3 dias em uma sala programada para operar com fotoperíodo invertido (12:12 h). Os machos foram mais atraídos pelos extratos hexânicos de fêmeas virgens. Este resultado também foi observado nos testes de campo, nos quais o número de machos capturados nas armadilhas contendo extrato hexânico de fêmeas virgens não diferiu do número de machos capturados nas armadilhas contendo fêmeas virgens vivas. Além da extração com solvente, também foi realizada extração por microextração em fase sólida. Os compostos presentes no extrato hexânico de fêmeas de *C. anonella* foram submetidos à análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, cujos resultados revelaram quatro compostos majoritários, denominados: (OOI), (OA) (OM) e (OAL) dentre outros compostos. A identificação dos compostos trabalhados nesta tese está sendo resguardado, devido a um sigilo de patente. Os dois primeiros compostos foram obtidos comercialmente e os dois últimos foram sintetizados empregando o composto OOI como material de partida. Os derivados olefínicos destes compostos também foram obtidos e empregados em bioensaios. A atividade biológica dos compostos sintéticos individuais e de misturas ternárias e quaternárias destes compostos foi determinada em bioensaios de laboratório empregando machos virgens de *C. anonella*, com idade variando entre 2-3 dias. Os tratamentos testados foram os seguintes: Compostos individuais denominados OM, OAL, OOI e OA; mistura quaternária de compostos saturados [(1 (OM): 3 (OAL): 5 (OOI): 5 (OA)]; mistura ternária de compostos insaturados [1 (OMI) 3 (OALI): 5 (OOII)], mistura ternária de compostos saturados [1(OM):3 (OAL):5(OOI)], disco de papel de filtro limpo e disco de papel de filtro impregnado com hexano. Os compostos individuais e misturas foram testados em duas concentrações: 0, 1 e 1,0 mg mL⁻¹, respectivamente. Nos ensaios de laboratório, procurou-se observar se a concentração e o grau de insaturação dos compostos e misturas testadas afetavam o comportamento de atração dos machos. Em relação às misturas testadas em laboratório, ficou evidenciado que as misturas dos compostos sintéticos podem ser consideradas, tão atraentes para machos quanto os extratos de fêmeas virgens. Os resultados dos testes de campo demonstraram que, dentre as misturas de compostos sintéticos testadas, as armadilhas contendo a mistura ternária de compostos saturados [1 (OM) 3 (OAL): 5 (OOI)] na concentração de 1 mg mL⁻¹ foi o tratamento que apresentou melhor resultado de captura. Pelo exposto, é seguro afirmar que, os compostos reportados neste estudo são constituintes do feromônio sexual de *C. anonella*. Além disso, este estudo também demonstrou que a técnica de Microextração em Fase Sólida (MEFS) é uma técnica confiável para a extração dos componentes do feromônio sexual desta espécie quando comparada com a aeração.

Palavras-chave: Feromônio sexual; *Cerconota*; *Annona muricata*; *Annona squamosa*.

ABSTRACT

This study aimed the extraction, identification and synthesis of the sex pheromone components of *Cerconota anonella* (Sepp.) (Lepidoptera: Oecophoridae) and to evaluate their efficiency on tests conducted under laboratory and field conditions. The ultimate goal of this research is to use the sex pheromone to control infestations of *C. anonella* based on the integrated pest management program for species of Annonaceae. Initially, to choose the best solvent for extraction of pheromone components, experiments were carried out using hexane and dichloromethane to wash the abdominal gland of 2-3 days-old *C. anonella* calling females. These extracts were used on bioassays performed under laboratory conditions using 2-3 days-old co-specific males in a room programmed to operate with an inverted photoperiod (12: 12 h). The males exhibited a strong response to the hexane extract of virgin females and this result was also seen on field tests, where it was observed that the number of males captured on traps baited with hexane extract of virgin females did not significant differ from the traps containing live calling virgin females. The chemical identification of components present in hexane extract of *C. anonella* was performed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry. These analyses showed four major compounds, namely: (OOI), (OA) (OM) and (OAL) among some other components. The first two compounds were obtained commercially and the other two were synthesized in the laboratory using OOI as starting material. The olefinic derivatives of these compounds were also obtained and used on bioassays. Individual synthetic components, ternary and quaternary mixtures of these compounds were submitted to laboratory bioassays using *C. anonella* virgin males, as follow: individual compounds labeled as (OM), (OAL), (OOI) and (OA); quaternary mixture of saturated compounds [1 (OM): 3 (OAL): 5 (OOI): 5 (OA)], ternary mixture of unsaturated compounds [1 (OMI) 3 (OALI): 5 (OOII)], ternary mixture of saturated compounds [1(OM):3 (OAL):5(OOI)], empty filter paper disc and filter paper disc impregnated with hexane. Individual compounds and mixtures were tested in two concentrations, as such: 0, 1 and 1,0 mg/ml, respectively. On laboratory bioassays, it was observed if changes in concentration and the degree of saturation of the tested compounds within the mixtures would affect the number of attracted males. Except for the individual compounds, all tested mixtures were attractive to males. Results from field tests revealed that, among the synthetic mixtures tested, the traps containing the saturated ternary mixture [1 (OM) 3 (OAL): 5 (OOI)] in a concentration of 1 mg / ml captured as many males as the trap containing live virgin females. No field tests were conducted with mixtures of unsaturated synthetic compounds. From these results, it is safe to conclude that the compounds reported on this study are indeed sex pheromone components of *C. anonella*. In addition, this study also shows that Solid Phase Microextraction (MEFS) is a reliable technique for extraction of *C. anonella* sex pheromone components as well as the dynamic headspace technique (aeration).

Keywords: Sexual pheromone; *Cerconota*; *Annona muricata*; *Annona squamosa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (a) <i>Annona muricata</i> , (b) <i>Annona squamosa</i> , (c) <i>Cerconota anonella</i> e (d) característica de ataque de <i>Cerconota anonella</i> .	19
Figura 2 – Esquema do comportamento reprodutivo de adultos do sexo masculino e feminino de <i>Cerconota anonella</i>	24
Figura 3 – Kit do feromônio sexual ferocitrus furão [®] comercializados no Brasil	29
Figura 4 – Rotas biossintéticas na produção de feromônios.	31
Figura 5 – Sistema utilizado para extração de voláteis por Headspace estático	33
Figura 6 – Sistema de extração de voláteis por headspace dinâmico	34
Figura 7– (a) Processo de Microextração em Fase Sólida (b) Dessorção térmica da fibra de Microextração em fase Sólida (MEFS)	38
Figura 8 – Esquema geral dos componentes de um cromatógrafo gasoso.	42
Figura 9 – Sequência do processo de obtenção e manutenção de insetos de <i>Cerconota anonella</i> em laboratório, onde: (A): fruto brocado, (B) lagarta retirada do fruto em dieta artificial (C) pupas de <i>Cerconota anonella</i> (D) gaiolas de vidro contendo pupas de <i>Cerconota anonella</i> separadas por sexo e (E) adultos de <i>Cerconota anonella</i> .	47
Figura 10 – Esquema representativo da extração da glândula produtora do feromônio, onde: (A) fêmea de <i>Cerconota anonella</i> , (B) corte na região abdominal, (C) adição de solvente, (D) transferência para ampola de vidro e (E) selagem. Fonte: Adaptado de Mendonça, (2009).	47
Figura 11 – Procedimento de extração dos COVs liberados pela fêmea de <i>C. anonella</i> por Microextração em fase Sólida (MEFS)	48
Figura 12 – Distribuição dos compostos: (OOI), (OM), (OA) e (OAL), em extrato hexânico da glândula abdominal de <i>Cerconota anonella</i> .	59
Figura 13 – Análise comparativa entre Microextração em fase Sólida (MEFS) e Extração com solvente (ES), para extração dos prováveis COVs feromonais.	60
Figura 14 – Esquema reacional da síntese do OAL	60
Figura 15 – Esquema reacional Síntese do OALI	61
Figura 16 – Esquema reacional Síntese do OM	61
Figura 17 – Esquema reacional síntese do OMI	61
Figura 18 – Comprovação pelo tempo de retenção, da presença do (OOI) no extrato de glândula de <i>Cerconota anonella</i>	62
Figura 19 – Comprovação pelo tempo de retenção, da presença do OM no extrato de glândula de <i>Cerconota anonella</i>	63
Figura 20 – Comprovação pelo tempo de retenção, da presença do OA extrato de glândula de <i>Cerconota anonella</i> .	64
Figura 21– Comprovação pelo tempo de retenção, da presença do OAL no extrato de glândula de <i>Cerconota anonella</i>	64
Figura 22 – Numero Médio (media \pm erro padrão) de machos de <i>C. anonella</i> capturados diante de compostos sintéticos identificados nos extratos de fêmeas.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Feromônios sexuais da família Oecophoridae.	29
Tabela 2 – Tipos de fibras de MEFS disponíveis comercialmente. Fonte: (Supelco, Bellefonte PA).	38
Tabela 3 – Descrição dos tratamentos utilizados nos testes com soluções dos compostos sintéticos.	56
Tabela 4 – Caracterização química do extrato da glândula abdominal de <i>C. anonella</i> .	58
Tabela 5 – Resposta de machos de <i>Cerconota anonella</i> diante de extratos do abdome de fêmeas virgens obtidos com hexano e diclorometano.	66
Tabela 6 – Média de captura de machos de <i>C. anonella</i> em pomar de <i>A. squamosa</i>	67
Tabela 7 – Médias obtidas nos ensaios de laboratório empregando os componentes do feromônio de <i>Cerconota anonella</i> .	69

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	Reflectância Total Atenuada
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CG/DIC	Cromatógrafo Gasoso com Detector de Ionização em Chamas
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
DIC	Detector de Ionização de Chama
FT-IR	Infravermelho com Transformada de Fourier
IQB	Instituto de Química e Biotecnologia
IOFI	International Office of the FlavorIndustry Analítica
MEFS	Microextração em Fase Sólida
MIP	Manejo Integrado de Pragas
PCC	Clorocromato de Piridínio
PDMS	Polidimetilsiloxano
PTV	Programmed Temperature Vaporizer
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPME	Solid Phase Microextraction
TNT	Tecido Não Tecido
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVO	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 <i>Annona muricata</i> e <i>Annona squamosa</i>	18
3.2 <i>Cerconota anonella</i> (Sepp., 1830) (Lepidoptera: Oecophoridae)	19
3.3 Métodos de controle	20
3.4 Feromônio em Lepidoptera	22
3.5 Aspectos químicos dos feromônios sexuais	26
3.6 Biossíntese de Feromônio de Lepidopteras	30
3.7 Métodos de Extração de Voláteis	31
3.7.1 Extração com solvente	32
3.7.2 O Headspace Estático e Headspace Dinâmico	33
3.7.2.1. O Headspace estático	33
3.7.2.2 O Headspace dinâmico	34
3.7.3 Microextração em Fase Sólida (MEFS)	35
3.7.3.1 Seleção da Fibra	37
3.7.3.2 Otimização da extração por MEFS	38
3.7.3.3 Otimização da dessorção	40
3.8 Cromatografia gasosa na Separação e Identificação dos Compostos Voláteis	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Coleta de frutos infestados	45
4.2 Obtenção de insetos	44
4.3 Obtenção de extratos de glândulas abdominais de <i>C. anonella</i>	46
4.4 Microextração em fase sólida com fêmeas de <i>Cerconota anonella</i>	48
4.5. Obtenção dos compostos padrões empregados nos experimentos	49
4.5.1 Síntese do OAL	49
4.5.2 Síntese do OM	49
4.6 Análise por cromatografia Gasosa (CG)	50
4.7 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)	50
4.8 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	51
4.9 Análise por Infravermelho (IV)	51
4.10 Identificação e quantificação dos compostos	51
4.11 Bioensaios	52
4.11.1 Formulação e Impregnação dos tratamentos em septos de borracha	52
4.11.2 Bioensaios com extratos de fêmeas de <i>C. anonella</i>	52
4.11.2.1 Bioensaios em laboratório	52
4.11.2.2 Bioensaios de campo	53
4.11.3 Bioensaios com soluções dos compostos padrões sintéticos	54
4.11.3.1 Bioensaios em laboratório	54
4.11.3.2 Bioensaios de campo	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 Análises Químicas do extrato da glândula de <i>Cerconota anonella</i>	58
5.2 Micro-extração em fase sólida com fêmeas de <i>C. anonella</i>	59
5.3 Preparação dos compostos identificados nos extratos de abdome de fêmeas de <i>C. anonella</i>	60

5.3.1 OAL	59
5.3.2 OALI	59
5.3.3 OM	60
5.3.4 OMI	60
5.4 Análise dos espectros de massas dos compostos de interesse presentes no extrato de glândula de <i>C. anonella</i>	62
5.5 Bioensaios com extratos de fêmeas de <i>C. anonella</i>	65
5.5.1 Comportamento de machos diante de extratos de fêmeas de <i>Cerconota anonella</i> .	65
5.5.2 Avaliação da atividade dos extratos de abdome de fêmeas de <i>C. anonella</i> na captura de machos em armadilhas de campo	66
5.6 Bioensaios com soluções dos compostos padrões sintéticos	67
5.6.1 Avaliação dos compostos sintéticos identificados nos extratos de fêmeas de <i>Cerconota anonella</i> na atração de machos co-específicos em ensaios de laboratório	67
5.6.2 Avaliação dos compostos sintéticos identificados nos extratos de fêmeas de <i>Cerconota anonella</i> na atração de machos co-específicos em ensaios de campo	69
6 CONCLUSÕES	72
7 PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

A família Annonaceae compreende cerca de 130 gêneros e 2300 espécies (ALALI, 1999), distribuídas em países de climas tropical e subtropical. No Brasil, essa família compreende 26 gêneros e aproximadamente 260 espécies, desempenhando um importante papel na composição da vegetação (MAAS et al., 2001).

As espécies da família Annonaceae, encontram-se distribuídas entre as áreas tropicais da América, África e Ásia. A África é o continente que contém o mais baixo número de espécies, com aproximadamente 450. Cerca de 900 espécies são encontradas nos Neotrópicos (América do Sul, América Central, parte do México e Caribe) e quase 1200 nas áreas tropicais da Ásia e Austrália (ARAYA, 2004).

O gênero *Annona* possui mais de 120 espécies catalogadas (JOLY, 1998) e é considerado muito importante economicamente, por apresentar algumas espécies que são amplamente cultivadas e comercializadas no Brasil, a saber: *Annona squamosa* L. (Pinha), *Annona muricata* L. (graviola), *Annona reticulata* L. (condessa) e *Annona cherimola* (cherimóia). Essas espécies são consideradas economicamente importantes, principalmente, devido às propriedades nutricionais dos frutos que são consumidos in natura ou na forma de sucos e sorvetes (LORENZI; MATOS, 2002). A gravioleira, por exemplo, é uma fruteira tropical, amplamente disseminada nas regiões litorânea e semi-árida do Nordeste brasileiro, onde encontra condições ideais de clima e solo para o seu desenvolvimento (FILHO et al., 1998).

A pinha (*A. squamosa* L.), também conhecida como fruta-do-conde ou ata é uma cultura que vem crescendo de forma acentuada em várias regiões do Brasil com destaque para a região Nordeste, graças aos recursos da irrigação, gerando emprego e renda, sobretudo, para as populações da região semiárida (MORAIS et al., 2009). Alagoas está entre os estados com crescente destaque no cultivo da pinheira, conforme Araujo et al. (1999) e Da Costa e Kiill (2003).

De acordo com a Secretaria de Estado do Planejamento e do Desenvolvimento Econômico a produção de pinha em Alagoas abrange três municípios localizados na meso-região geográfica do Agreste Alagoano: Estrela de Alagoas, Igaci e Palmeira dos Índios, sendo a principal fonte de renda de cerca de 1200 produtores, em sua maioria da agricultura familiar, ocupando uma área

estimada em 2.000 hectares, distantes de Maceió 145 km/média (SEPLANDE, 2013).

A produção de *A. muricata* (graviola) e *A. squamosa* (condessa), encontra-se ameaçada devido à ação de alguns insetos-pragas, dentre as quais pode-se citar, a broca da semente, *Bephratelloides pomorum* (Fabricius, 1908) (Hymenoptera:Eurytomidae), que no Brasil, ocorre em todas as regiões onde a gravioleira, por exemplo, é cultivada sendo considerada uma das principais pragas da cultura, podendo levar a perdas acima de 80% . A gama de hospedeiros desta praga engloba *A. muricata*, *A. reticulata* (pinha), *A. squamosa* (pinha), *A. cherimola* (cherimóia) e outras espécies de *Annona* (MOURA et al., 2006).

A broca do fruto, *Cerconota anonella* (Sepp.) (Lepidoptera: Oecophoridae), objeto deste estudo, é outra praga que causa grandes prejuízos aos produtores. Ela é considerada uma das pragas mais sérias do gênero *Annona*. Os danos expressivos causados aos frutos são caracterizados pelo apodrecimento da polpa e, externamente, a parte atacada torna-se endurecida e enegrecida, reduzindo seu valor comercial, tornando-os impróprios para a comercialização *in natura* ou para o processamento industrial (PEREIRA et al., 2009). Aliado a esses fatores, quando o ataque ocorre em frutos novos, resulta em sua queda prematura (GALLO et al., 2002).

Alguns estudos buscando métodos para o controle desta praga, que sejam alternativos ao uso indiscriminado de inseticidas têm sido realizados, dentre os quais destacam-se: o ensacamento dos frutos verdes empregando-se sacos perfurados (BROGLIO-MICHELETTI et al., 2001), o uso de parasitoides (BUSTILLO; PEÑA, 1992), ou ainda, a pulverização dos frutos com extratos aquosos de plantas (BRITO, 2010). No entanto, a viabilidade destes métodos, possui algumas limitações tais como, alta exigência de mão de obra, carência de investigações e em muitos casos um alto custo econômico.

A pesquisa envolvendo semioquímicos tem sido bastante realizada, uma vez que, apresenta vantagens importantes do ponto vista de aplicação prática e do ponto vista ambiental. Neste sentido, e considerando os feromônios, pode-se citar a alta especificidade (espécie-específico), sua eficácia, dada as baixas concentrações de atividade e seu caráter atóxico.

Devido aos prejuízos evidentes e a ausência de produtos registrados para o controle de *Cerconota anonella*, faz-se necessária à pesquisa envolvendo, a busca

Introdução*Edjane Vieira Pires*

por alguma metodologia de controle, tal como, o uso semioquímicos cujo emprego seja efetivo no controle de *C. anonella*, quer seja na interrupção do acasalamento (feromônio sexual) ou na deposição de ovos na superfície dos frutos de *A. muricata* e *A. squamosa*). Vale ressaltar que este é primeiro relato sobre o feromônio desta espécie.

2 OBJETIVOS

- (i) Extrair os constituintes químicos do feromônio sexual liberado por fêmeas virgens de *C. anonella*;
- (ii) Avaliar a extração por solvente, como método de extração dos compostos voláteis da glândula abdominal, de fêmeas virgens de *C. anonella*, por meio da comparação com o método de extração por Microextração em Fase Sólida (MEFS);
- (iii) Avaliar o potencial de atração do extrato das glândulas abdominais da fêmea de *C. anonella* em ensaios de laboratório e de campo;
- (iv) Identificar, através das técnicas de Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) os componentes do feromônio sexual de *C. anonella*.
- (v) Avaliar a eficiência do feromônio sexual em ensaios de laboratório e de campo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Annona muricata* e *Annona squamosa*

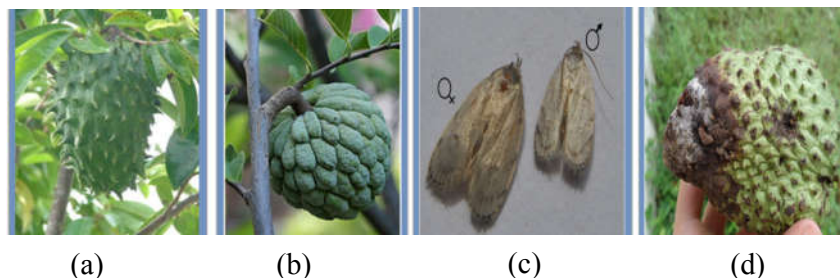
A fruticultura é uma atividade de grande importância para o setor agrícola brasileiro. O país ocupa o terceiro lugar em produção de frutas, com uma produção estimada em mais de 41 milhões de toneladas no ano de 2009 (IBRAF, 2011) e uma receita de cerca de R\$ 17,7 bilhões (IBGE, 2011).

A graviola e a pinha são frutas tropicais de grande aceitação comercial, sendo amplamente cultivada nas regiões: Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. Estes frutos tem considerável importância, graças à crescente demanda e interesse pela polpa, por parte do consumidor e das indústrias que utilizam o fruto como matéria-prima para produção de doces, iogurtes, produtos medicinais, cosméticos e outros (JUNQUEIRA et al., 1996).

A pinha, fruta-do-conde ou ata é uma planta originária das Antilhas. Encontra-se disseminada em quase todos os continentes. Foi introduzida no Brasil, precisamente na Bahia, na terceira década do século XVII. É cultivada em todo o Brasil, comercialmente ou em pequenas propriedades. Classificada como exótica, inclusive no mercado interno, as variedades de pinha, representam, a princípio, uma alternativa de negócio atraente, dado os elevados preços que seus frutos alcançam no mercado, com conseqüente interesse por parte dos produtores (BRAGA SOBRINHO, 2010).

Entretanto, a broca do fruto, *Cerconota anonella* (Sepp., 1830) (Lepidoptera: Oecophoridae) limita o cultivo dessa planta, pelos danos expressivos que causa ao fruto (**Figura 1**, pág. 19), reduzindo a produção da cultura, sendo essa, considerada a principal praga em frutos das anonáceas cultivadas em toda região Tropical (BRAGA SOBRINHO et al., 1999; OLIVEIRA, 2001; CARDOSO, 2002).

Figura 1 – (a) *Annona muricata*, (b) *Annona squamosa*, (c) *Cerconota anonella* e (d) característica de ataque de *Cerconota anonella*



Fonte: Autora, 2012

3.2 *Cerconota anonella* (Sepp., 1830) (Lepidoptera: Oecophoridae)

A penetração da lagarta de *Cerconota anonella* no fruto ocorre, geralmente, a partir do 4^o dia após a eclosão, através de galerias feitas pelas próprias lagartas (MELO, 1991; PEÑA et al., 2002; BITTENCOURT et al., 2007). Os sintomas característicos do ataque dessa broca são os excrementos eliminados pela lagarta na polpa e o escurecimento da casca, causado por fungos oportunistas (BRAGA SOBRINHO et al., 1999).

O ciclo de vida de *C. anonella*, de ovo a adulto, segundo Bustillo e Peña (1992) é de 36,4 dias em média, em condições de laboratório e dieta natural. Durante o ciclo biológico, o inseto passa por quatro instares, com período de incubação de, aproximadamente, sete dias, e as lagartas apresentam cinco instares, com duração total de 19 dias em média, e a fase de pupa em torno de 10 dias (BUSTILLO; PEÑA, 1992; PEÑA et al., 2002).

De acordo com Gallo et al. (2002), após 20 dias alimentando-se do fruto, as lagartas abrem uma galeria até a superfície da casca, onde constroem, com fragmentos do fruto e fios de seda, uma câmara saliente chamada “lingueta”, no interior da qual se transformam em pupa, de onde, decorridos 10 dias, emerge o adulto.

As posturas são feitas aleatoriamente e embora haja preferéncia pelo fruto verde, a oviposição envolve diferentes estágios de desenvolvimento da graviola (BRITO, 2010). A lagarta é de coloração que varia do rosado ao verde-pardo com comprimento de cerca de 20 mm, e é a responsável pelo ataque e destruição das graviolas de todos os tamanhos. As pupas medem de 8 a 10 mm de comprimento e

são de coloração castanho-escuro brilhante. Os adultos são mariposas de coloração branca-acinzentada com reflexos prateados. As asas apresentam bordos franjados, com fenda branco-prateada, caracteristicamente com três listas encurvadas, irregulares, de cor marrom ou cinzenta, possuindo a fêmea cerca de 25 mm de envergadura. (MELO, 1991; PINTO; SILVA, 1994).

Os prejuízos causados por *C. anonella* em anonáceas comerciais podem variar de 60 a 100% da produção, dependendo da espécie, pois naquelas em que a comercialização é por frutos *in natura*, o dano causado por uma única lagarta representa perda total do fruto, pois o mesmo fica impróprio para o consumo (BRAGA SOBRINHO et al., 1999; SILVA, 2011).

3.3 Métodos empregados no controle de *Cerconota anonella*

Apesar de não haver nenhum princípio ativo registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, diversos autores recomendam para controle da broca do fruto produtos organo-sintéticos utilizados em outras culturas e para outras pragas (BLEICHER; MELO, 2002).

Alguns autores aconselham o uso combinado do controle manual e inseticida. Pinto e Silva (1994) recomendam, como medida de controle da broca do fruto, a coleta e a queima dos frutos atacados que se encontram na planta ou no chão. Em seguida, a pulverização das inflorescências e dos pequenos frutos com os inseticidas à base de triclorfon (Ácido dimetilfosfónico, 2,2,2 Tricloro-1, Hidroxietyl éster) ou à base de fenthion (O, fosforotioato O-dimetil do o fenil 3-metil-4- metiltiol), os quais ainda encontram-se sem licenciamento da ANVISA para emprego no controle desta praga.

Lopes et al. (1994) afirmam que o controle deve visar a lagarta na sua fase inicial e também sugere triclorfon® ou fenthion®, os quais são inseticidas a base de cloro e fósforo, caracterizados como produtos com boa ação para esse fim.

O triclorfon é uma substância química que funciona como inseticida de contato, pertencente ao grupo organoclorofosforado, medianamente tóxico e perigoso ao meio ambiente. O fenthion caracteriza-se por agir como inseticida de contato e ingestão, do grupo organofosforado, também altamente tóxico e muito perigoso ao meio ambiente (DE MELO, 2006).

Algumas medidas de controle culturais são indicadas para *C. anonella*, são elas: catação e queima ou enterrio dos frutos atacados e poda de formação e rejuvenescimento. Medidas físicas, como a utilização de armadilhas luminosas também são recomendadas (MELO et al., 1983; CALZAVARA; MÜLLER 1987; EMATER, 1989).

Um estudo realizado por, Broglio-Micheletti e Berti-Filho (2000) testando métodos químico e cultural para o controle de *C. anonella*, demonstrou que os frutos cobertos com saco plástico microperfurado ficam menos expostos a ação da *C. anonella*, os quais, além de proteger os frutos, trazem a vantagem de não permitir o acúmulo de água nestas embalagens, o que, segundo McComie (1987), favoreceria o crescimento e a proliferação de microrganismos que causam a podridão mole e/ou mumificação nos frutos.

O ensacamento é uma forma de controle viável e segura, mas a limpeza do campo deve ser o primeiro passo para se ter sucesso com o controle de pragas em anonáceas, pois os adultos continuam a emergir de frutos infestados mesmo após eles terem caído ao solo, servindo como fonte de reinfestação. Na medida do possível, tais frutos devem ser removidos das árvores e do solo que fica sob elas e, completamente destruído (BROGLIO-MICHELETTI; BERTI-FILHO, 2000).

O tratamento com involucro de TNT (Tecido Não Tecido) combinado a pulverização com óleo emulsionável de nim (Neemsetoc) a 1,0%, foi dentre outras combinações, o mais eficiente na proteção de frutos contra danos da broca do fruto, segundo Brito (2010).

O controle biológico pode ser feito empregando-se dois parasitóides: *Apanteles* sp. (Hymenoptera: Braconidae) e um desconhecido pertencente a subfamília Rogadinae, os quais foram identificados como inimigos naturais da lagarta de *Cerconota anonella* por Bustillo e Peña (1992). Estes mesmos autores também relataram sobre o parasitismo em ovos de *C. anonella*, em condições de laboratório, pelo parasitóide *Trichogramma xiguum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae).

Broglio-Micheletti e Berti-Filho (2000), após criterioso estudo sobre parasitóides de *Cerconota anonella* indicaram como inimigos naturais *Apanteles* sp. (Hymenoptera: Braconidae); *Rhysipolis* sp. (Hymenoptera: Braconidae,) e *Xiphosomella* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) sendo *Apanteles* sp. o gênero do principal inimigo natural de lagartas de *C. anonella*.

Extratos e óleos de plantas com propriedade inseticida também representam uma alternativa válida para o controle de pragas. Para *Cerconota anonella* (BRITO, 2010) constatou que o extrato aquoso do pedúnculo do botão floral do craveiro-da-india e de *Piper aduncum*, na concentração de 10 %, são promissores como alternativa de controle da broca do fruto das anonáceas. E ainda segundo este autor, o extrato aquoso do pedúnculo do botão floral do cravo-da-india, a 10 % de concentração e o óleo emulsionável de neem (Neemsetoc) a 1 % de concentração, aplicados por pulverização sobre lagartas de *C.anonella* causaram mortalidade média de 10 %, 12 horas após a aplicação dos tratamentos em laboratório.

A substituição de agroquímicos para o controle de pragas e doenças, por meios alternativos eficientes, é um dos grandes desafios da agricultura sustentável. Uma alternativa cada vez mais buscada é possibilidade do uso dos feromônios que podem ser usados para a captura em massa e a interrupção de acasalamento de insetos, principalmente para lepidópteros e coleópteros (BARTELL 1982; HARDIE; MINKS, 1999), bem como para o monitoramento e levantamento populacionais de pragas existentes.

3.4 Feromônio em Lepidoptera

O termo feromônio foi proposto para os compostos químicos usados na comunicação entre indivíduos de uma determinada espécie, isto é, uma substância química ou uma mistura de substâncias químicas que são secretadas por um indivíduo e provocam uma resposta imediata no comportamento sexual do indivíduo receptor (DE LIMA, 2001).

A pesquisa que objetiva a obtenção de determinado feromônio sexual, deve partir do conhecimento sobre o comportamento reprodutivo do inseto, cuja principal intenção é saber o horário em que a fêmea inicia a liberação do feromônio, quanto tempo demora essa emissão e a modificação comportamental observada no macho, enquanto receptor do feromônio (DA SILVA et al., 2006).

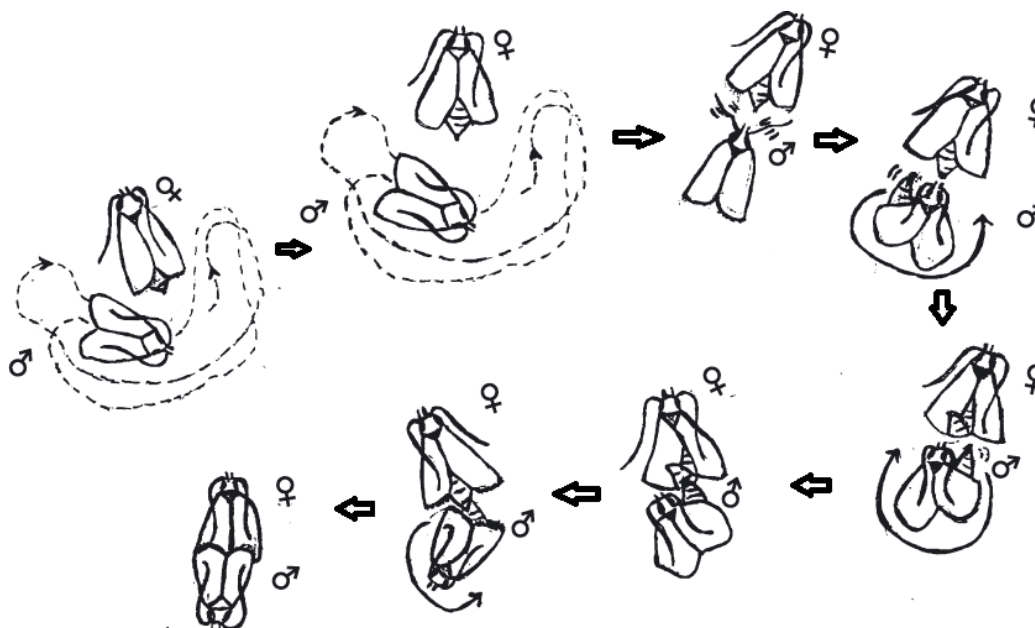
Para várias espécies de Lepidoptera, o amanhecer ou o anoitecer são os sinais que desencadeiam o ritmo circadiano do comportamento de chamamento e a consequente emissão do feromônio sexual (BACKER; CARDÉ, 1979; HICKEL; VILELA, 1991; PIRES, VILELA, VIANNA., 1994). De maneira geral, antes do acasalamento o inseto adota o comportamento de chamamento, assumindo posição

característica, a qual otimiza a dispersão do feromônio sexual no ambiente (BATISTA-PEREIRA et al., 2004)

Conforme Fonseca et al. (2006), uma característica da *C. anonella* é o poliandrismo, isto é, as fêmeas acasalam mais de uma vez com diferentes machos; entretanto estudos conduzidos por Da Silva et al. (2006), demonstraram que, após o acasalamento, as fêmeas de *C. anonella* não aceitam outra cópula. Estes autores também verificaram a existência de uma sincronia entre os comportamentos de chamamento e de corte exibidos por fêmeas e machos de *C. anonella* (**Figura 2**, pág. 21) e que a sequência de comportamento de corte exibida pelos machos de *C. anonella* difere, sutilmente, da que é exibida pela maioria dos machos de lepidópteros, por apresentar uma flexibilidade do abdome. A cópula entre indivíduos desta espécie, tem a duração de 42 min (Da SILVA et al. 2006).

De maneira análoga a outras espécies de lepidópteros, a comunicação entre machos e fêmeas de *C. anonella* deve ser mediada por feromônios e a percepção destes sinais pelos machos desencadeia uma série de comportamentos que é expressa em uma sequência padrão. Essa sequência inclui a movimentação das antenas, caminhar, vibrar as asas, levantar voo, voar em zigzag, localizar a trilha, voar contra o vento seguindo a trilha de feromônio, localizar a fonte de feromônio, pousar nessa fonte ou áreas adjacentes, caminhar e movimentar as asas até encontrar a fêmea. Essa é a cadeia de respostas à longa distância. O encontro com a fêmea inicia outra cadeia de respostas, de curta distância, em que o macho interage com as fêmeas e eventualmente, pode levar à cópula (ROELOFS; CARDÉ, 1977).

Figura 2 – Esquema do comportamento reprodutivo de adultos do sexo masculino e feminino de *Cerconota anonella*



Fonte: Adaptado de: Da Silva et al, 2006.

De modo geral, o estudo dos feromônios de insetos-praga é motivado principalmente por causa dos prejuízos econômicos, causados pelos insetos, os quais geralmente estão acompanhados pelos danos ambientais e de saúde pública causados pelo uso de produtos químicos de ação pesticida. Portanto essa busca se encaixa no princípio do Manejo Integrado de Pragas (MIP) que pode ser definido como um sistema de manejo de pragas que associa o ambiente e a dinâmica populacional da espécie, utilizando todas as técnicas apropriadas e métodos de forma tão compatível quanto possível mantendo a população da praga em níveis abaixo daqueles capazes de causar dano econômico (WAQUIL, VIANA, CRUZ, 2006). No Brasil, até o ano de 2009, na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) foram registrados 28 feromônios para o controle de insetos-praga na agricultura (ZARBIN, 2009).

Os feromônios são predominantemente voláteis, mas algumas vezes, são substâncias químicas líquidas; são produzidas por glândulas exócrinas, que secretam seus produtos diretamente para o ambiente (GULLAN; CRANSTON, 2007; KLOWDEN, 2007) e são classificados conforme a categoria de comportamento, associados com o sexo, agregação, dispersão, formação de trilha e alarme

(GULLAN; CRANSTON, 2007), além destes, Klowden (2007) também citou o feromônio de funeral, produzidos principalmente por formigas para que as operárias retirem do ninho os insetos mortos.

Os feromônios sexuais são usados no monitoramento, captura massal e na confusão sexual de pragas. Mais de 90% dos produtos comerciais a base de feromônios são utilizados no monitoramento, que consiste na captura de machos e/ou fêmeas para detecção de surtos populacionais, época de emergência dos insetos adultos e detecção de presença, distribuição e abundância dos insetos (IBARRA, 2006).

Os feromônios são percebidos pelos receptores olfativos e desencadeiam uma resposta no inseto receptor via sistema nervoso central (CHAPMAN, 1998). Os insetos identificam os feromônios através de sensilas quimiorreceptivas como: sensila tricoide (GULLAN; CRANSTON, 2007; GRIES et al., 2010), sensila basicônica, e sensila celocônica, que são distribuídas entre os táxons e estruturas dos insetos, mas com frequência são mais concentradas nas antenas (GULLAN; CRANSTON, 2007).

A vantagem do monitoramento com feromônio é a rápida detecção pelo inseto mesmo em baixa densidade populacional, diferentemente de outros métodos de amostragem. As armadilhas de feromônio detectam adultos que estão emergindo ou emigrando, e isto pode ser um sinal de alerta para a tomada de decisão de controle. As armadilhas de feromônio são muito eficientes por sua especificidade, além disso, seu uso é muito fácil (WALL, 1989).

A ordem Lepidoptera consiste de cinco subordens, 127 famílias, e mais de 150.000 espécies (PELLMYR; LEEBENS-MACK, 1999). As mariposas (hábito noturno) e borboletas (hábito diurno) pertencem a esta ordem, com pelo menos, 150,000 espécies (STRANDH, 2006). O primeiro feromônio sexual de mariposa foi identificado no bicho da seda, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae), e no mesmo ano (1958), uma definição de feromônios foi publicada. Os pioneiros, Butenandt et al. (1959) utilizaram em 20 anos, meio milhão de abdômenes de fêmeas para elucidar a estrutura química deste feromônio (STRANDH, 2006).

Os feromônios sexuais desempenham papel fundamental no comportamento de atração e acasalamento de insetos (ZHANG et al., 2012). Vários já foram identificados em centenas de espécies de lepidópteros (ARN et al., 1992; EL-SAYED, 2009). Uma característica de lepidópteros com hábito noturnos é que o

reconhecimento do feromônio pelo macho ocorre a longas distâncias, quando é a fêmea quem emite esse sinal químico (CARDE; BAKER, 1984), enquanto em distâncias curtas, as fêmeas detectam feromônios emitidos por machos (ANDO et al., 2004). Alguns lepidópteros noturnos têm habilidades acústicas que os ajudam a evitar a predação de morcegos insetívoros (SURLYKKE et al., 1998), e algumas destas espécies podem usar som para reconhecimento do parceiro (CONNER, 1999; NAKANO et al., 2009). Estes resultados sugerem que lepidópteros noturnos podem reconhecer seus parceiros para o acasalamento usando uma sinergia de feromônios sexuais e pistas acústicas.

3.5 Aspectos químicos dos feromônios sexuais

Os feromônios da maioria dos lepidópteros são constituídos por misturas de compostos químicos, os quais definem como a comunicação olfativa ocorre (STRANDH, 2006). Uma questão atual e importante é como a química e biologia está envolvida nessa comunicação (WITZGALL et al., 2010). A comunicação química parece prevalecer sobre todas as outras formas de comunicação seja física, visual, auditiva ou tátil no reino animal (SONENSHINE, 2006).

O conceito da especificidade do sinal químico tem sido a força central na análise dos comportamentos exibidos pelos machos de mariposas ao feromônio coespecífico. Os estudos comportamentais definem a atividade biológica de extratos naturais e são essenciais para a identificação do feromônio sexual de uma espécie (EIRAS; MAFRA NETO, 2001). Sem dúvida a resposta dos machos é dependente da detecção e reconhecimento de uma mistura precisa de componentes. A liberação e percepção dos feromônios nos insetos dependem de sua condição fisiológica e de uma ampla variedade de condições ambientais que estes organismos podem experimentar durante sua vida (CUSSON; MCNEIL, 1989; TANG et al., 1989; DE LIMA, 2001; MICHEREEF, et al 2007; SILVA, 2008).

A produção, liberação e resposta aos feromônios são controladas por fatores endógenos, como idade (DE LIMA, 2001), e modificadas por fatores exógenos, tal como fotoperíodo e temperatura (DELISLE; MCNEIL 1987; SCHAL et al., 1987; DE LIMA, 2001).

Os trabalhos iniciais sobre feromônio de lepidópteros envolviam apenas uma substância, isto é, os feromônios tinham uma composição bastante simplificada. A

exemplo de ocorrência de sistemas nos quais uma única substância é capaz de desencadear a sequência completa de atração e comportamento pré-copulatório nos machos, de *Cydia nigricana* (Fabricius, 1794) (WALL et al., 1989) e em *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (DE LIMA, 2001).

Os feromônios sexuais de fêmeas (lepidópteros) são formados, em geral, por compostos alifáticos derivados de ácidos graxos, com número de átomos de carbono variando entre 10 e 23. Um típico feromônio sexual de lepidópteros é constituído por dois ou três compostos estruturalmente relacionados numa proporção específica. Os compostos frequentemente contêm um grupo funcional oxigenado, tais como acetatos, álcoois ou aldeídos, ou ainda, grupos funcionais posicionados em locais específicos sobre a cadeia de carbono, tais como epóxidos e cetonas. A presença de insaturação é comum nestes feromônios, compreendendo entre uma e três ligações duplas, com estereoquímica posicional e geométrica específica (JURENKA et al., 1994; CHOI et al., 2002; CORK et al., 2008; YAMAKAWA et al., 2009).

A geometria das duplas ligações do tipo *Z* (*cis*) (68%) predomina sobre as do tipo *E* (*trans*) (29%), sendo que, o restante são duplas ligações terminais. Somente em 1996 foi identificado o primeiro composto com três ligações duplas, como componente do feromônio sexual da espécie *Thaumetopoea pityocampa* (*Lepidoptera*:Thaumetopoeidae) (YAMAKAWA et al., 2009).

A primeira evidência de sinergismos em sistemas multicomponentes de feromônio sexual em lepidópteros foi relatada em espécies da família Tortricidae, mais especificamente, do gênero *Adoxophyes* (DE LIMA, 2001). Nas espécies deste gênero, os componentes principais do feromônio sexual de fêmeas incluem acetato de 9 (*Z*)-tetradecenila e o acetato de 11 (*Z*)-tetradecenila. Neste caso, as respostas comportamentais de machos de espécies deste gênero foram evidentes somente quando os dois componentes foram testados simultaneamente em ensaios empregando as antenas de machos e os componentes individuais não eliciaram nenhuma resposta. A importância da proporção e a relação precisa dos componentes múltiplos em feromônios sexuais de lepidópteros foram então estabelecidas (TAMAKI et al., 1979).

Outro exemplo, é o feromônio sexual, 5,9-dimetilpentadecano, produzido pelas fêmeas do bicho-mineiro do café, *Leucoptera coffeella* (Guérin-mèneville) (*Lepidoptera*: Lyonetiidae). Essa molécula possui quatro formas enantioméricas, ou

seja, os carbonos 5 e 9 permitem giros na molécula, podendo resultar em quatro compostos diferentes denominados esteroisômeros, formando 5S,9S-dimetilpentadecano, 5R,9S-dimetilpentadecano, 5S,9R-dimetilpentadecano e 5R,9R-dimetilpentadecano (IBARRA, 2006).

Sendo assim, são evidentes as mudanças em relação à complexidade da composição química dos feromônios. O feromônio sexual de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae), identificado por Jacobsen et al. (1970) como uma mistura de acetato de (Z,E)-9,12-tetradecadienila e acetato de (Z)-9-tetradecenila, é um exemplo de um feromônio sexual multicomponente em lepidópteros. Até o presente momento, foram descritos os feromônios sexuais de seis espécies de lepidópteros pertencentes a família Oecophoridae, (Tabela 1).

Tabela 1 – Feromônios sexuais da família Oecophoridae

Espécie	Compostos	Referência
<i>Esperia sulphurella</i> (Fabricius, 1775)	Acetato de 8- <i>cis</i> dodecenila e 8,10 <i>trans</i> dodecadien-1-ol	ALFORD, 1978
<i>Diurnea phryganella</i> (Hübner, 1801)	Acetato de 11(Z)-tetradecenila	TÓTH, et al., 1979
<i>Cheimophila salicella</i> (Hübner, 1796)	Acetato de 11(E)-tetradecenila, 11(E)-tetradecen-1-ol, acetato de tetradecenila e 11(E)-tetradecenal	GILLESPIE, et al., 1984
<i>Pseudatemelia josephinae</i> (Toll, 1956)	Acetato de 10(Z)- tetradecenila e Acetato d 9(E)-tetradecenila	MOZILRAITIS, et al., 1998.
<i>Stathmopoda masinissa</i> (Meyrick 1906)	Acetato de 4(E) 6(Z) hexadecadienila, 4(E) 6(Z) hexadecadienol, 4(E) 6(Z)- hexadecadienal	NAKA, et al., 2003.
<i>Depressaria olerella</i> (Zeller, 1854)	11(E)-tetradecenal e 11(Z)-tetradecenal	OSTRAUSKAS, et al., 2010

Muitos constituintes dos feromônios sexuais têm sido analisados e sintetizados artificialmente para serem aplicados no controle de pragas na agricultura (DURANT et al., 1995; NAKA et al., 2003). A especificidade e alto nível de bioatividade de feromônios sexuais de lepidópteros têm atraído considerável interesse no controle de pragas de culturas (WYATT, 1997; HOWSE, STEVENS, JONES, 1998) por meio da utilização de uma variedade de técnicas, incluindo a interrupção na comunicação que leva a mariposa fêmea, caracterizando a confusão sexual (SANDERS, 1997) e atração a uma fonte letal, como em atraí-e-mata e captura massal (CORK et al., 2003; EL-SAYED et al., 2006). A escolha da armadilha

é crucial no desenvolvimento de sistemas de captura. No monitoramento de Lepidoptera, os tipos mais comuns de armadilhas são aquelas que possuem uma superfície pegajosa para manter o inseto preso (**Figura 3**, pag. 27) (TREMATERRA, 2012).

Figura 3 – Kit do feromônio sexual *ferocitrus furão*[®] comercializados, no Brasil



Fonte: Carvalho, 2003

De acordo com Kolenbrander et al. (2002), a evolução na estrutura química dos feromônios de Lepidopteras, se deve em grande parte as alterações nas enzimas-chaves das rotas biosintéticas dos compostos dos feromônios que podem produzir diferenças na estrutura e proporção de compostos.

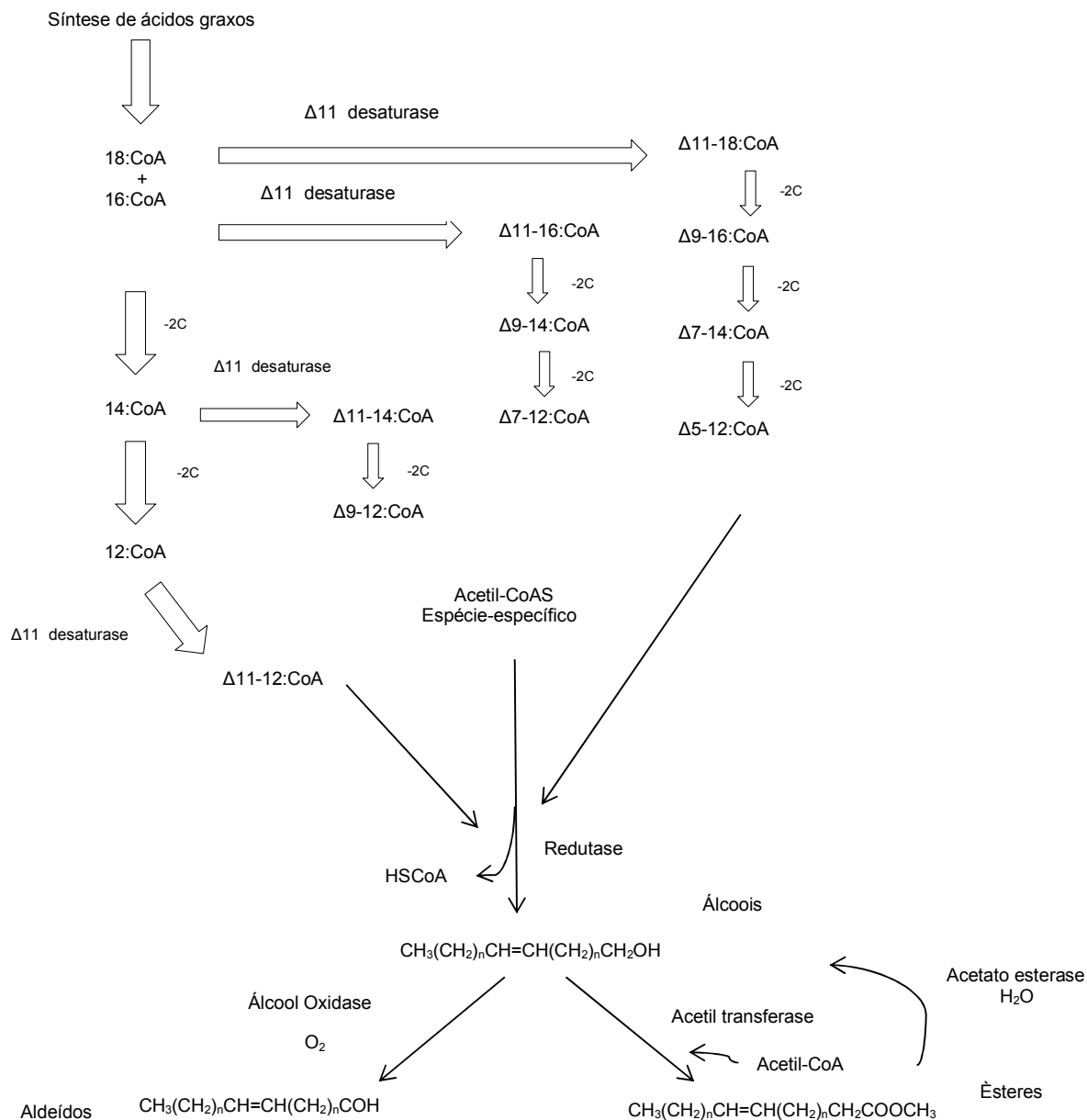
3.6 Biossíntese de Feromônio de Lepidoptera

A maioria dos feromônios sexuais de fêmeas de lepidópteros são misturas de compostos derivados de ácido graxo de cadeia longa contendo de 12 a 18 átomos de carbonos, além de um grupo funcional oxigenado e ligações duplas com geometria *Z* ou *E* (STRANDH, 2006).

Os produtos do metabolismo normal, particularmente o metabolismo dos ácidos graxos, são modificados por algumas enzimas de feromônios glândula-específicas para produzir essa grande variedade de moléculas de feromônios que ocorrem em espécies de lepidópteros (BLOMQUIST; VOGT, 2003).

As rotas biosintéticas para a formação dos feromônios sexuais de lepidópteros são semelhantes, envolvendo enzimas que fazem a dessaturação (dessaturases), o encurtamento da cadeia por β -oxidação e a modificação do grupo funcional final por redução (redutases), acetilação (acetiltransferases) ou oxidação, (**Figura 4**, pág. 28) (STRANDH, 2006; ALBRE, 2012).

Figura 4 – Rotas biossintéticas na produção de feromônios



Fonte: Adaptado de Strandh, M., 2006

3.7 Métodos de Extração de Voláteis

Na análise dos compostos voláteis, a preparação da amostra é considerada a etapa inicial e crucial para obtenção de informações representativas do odor característico de uma matriz, pois qualquer modificação causada na composição dos

voláteis da amostra nesta etapa inicial não mais poderá ser corrigida, por mais sofisticados que sejam os instrumentos utilizados nas etapas subsequentes. O desenvolvimento e aplicação de uma metodologia para determinação da composição química dos compostos voláteis é uma tarefa desafiadora (SIDES, ROBARDS, HELLIWELL. 2000; LEITE; LOPES et al., 2003), pois a técnica aplicada para a extração deve ser capaz de extrair os componentes voláteis enquanto limita a formação de artefatos (FRANCO, 2003).

Dentre as técnicas tradicionais, a hidrodestilação e a destilação por arraste a vapor são extensivamente aplicadas para extração de compostos voláteis de aromas. Dentre as técnicas recentes para coleta de compostos voláteis destacam-se a extração com solvente, microextração em fase sólida e o *headspace* dinâmico (LEITE; LOPES., 2003).

3.7.1 Extração com solvente

A extração com solvente orgânico é um método importante e muito utilizado para o isolamento dos compostos voláteis, foi um dos primeiros métodos utilizados para recuperar compostos de aroma, principalmente em alimentos, sendo usada ainda pelas indústrias de perfumaria e de cosmético (NOGUEIRA, 2002).

No entanto, os baixos níveis de compostos recuperados aliado ao nível de componentes co-extraídos da matriz restringem o uso da extração direta. Outro problema da técnica é a formação de emulsões, principalmente se compostos não voláteis estiverem presentes na amostra. Esta técnica utiliza tanto solventes puros quanto misturas, sendo o diclorometano, éter etílico, éter de petróleo, pentano e o hexano os solventes mais utilizados, principalmente por apresentarem um baixo ponto de ebulição, permitindo que os componentes mais sensíveis não sejam destruídos por aquecimento, além da seletividade, permitindo que as substâncias odoríferas sejam removidas primeiro (MARSILI, 1997; NOGUEIRA, 2002).

Apesar da sua simplicidade, a tendência moderna é substituir a extração líquido-líquido por outras técnicas, devido à alta pureza dos solventes que são requeridos para análise de compostos em baixíssimas concentrações (traço), a necessidade de redução no ambiente de solventes orgânicos e ao risco a saúde associado a sua manipulação além de não ser aplicada para análise de compostos voláteis em amostras vivas (LEITE; LOPESI., 2003).

No caso da extração de semioquímicos esta técnica é bastante utilizada, visto que, o volume de solvente utilizado, de modo geral, é pequeno. Além disso, apresenta como vantagem em relação a outras técnicas, como a micro extração em fase sólida, a possibilidade de armazenamento dos extratos.

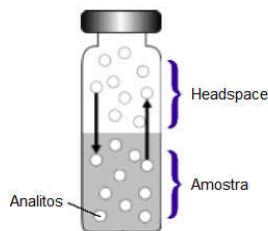
3.7.2 O *Headspace* Estático e *Headspace* Dinâmico

3.7.2.1 O *Headspace* estático

O caminho mais simples para avaliar a composição química de um aroma é a análise direta do *headspace*. No entanto, devido os compostos voláteis estarem presentes em concentrações muito baixas, muitas vezes torna-se inviável a aplicação desta técnica. Todavia, quando instrumentos com limite de detecção adequado são utilizados e, dependendo da concentração do analito, o *headspace* estático pode ser utilizado devido a sua simplicidade (FRANCO, 2003).

Na análise estática do *headspace*, a amostra é fechada em um recipiente, onde o equilíbrio é atingido entre o *headspace* e fase extratora a uma temperatura predeterminada (**Figura 5**). Os voláteis presentes no *headspace* são retirados através de uma seringa ou um instrumento similar e injetado diretamente no cromatógrafo gasoso (AGELOPOLUS; PICKETT, 1998).

Figura 5 – Sistema utilizado para extração de voláteis por *Headspace* estático



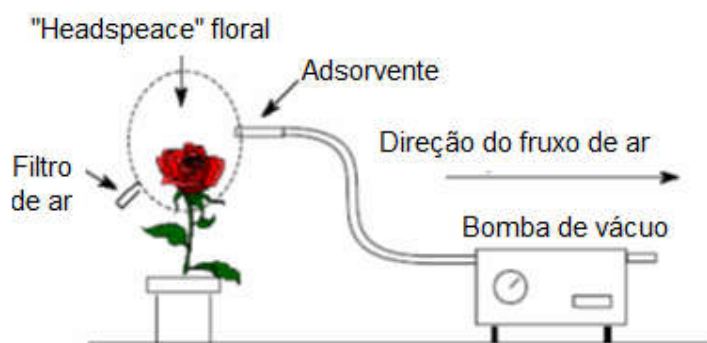
Fonte: Adaptado de: NOGUEIRA, 2002

3.7.2.2 O *Headspace* dinâmico

Na análise do *headspace* dinâmico, a amostra é confinada em um recipiente fechado e um gás (geralmente ar purificado) é passado através da amostra. Os voláteis liberados pela amostra são carregados pelo gás e uma armadilha coleta e concentra os compostos voláteis (**Figura 6**, pág. 34). O procedimento dinâmico

impede o estabelecimento de um estado de equilíbrio, causando uma maior dispersão dos voláteis emitidos pela amostra para o *headspace*, que são constantemente removidos resultando na melhora da sensibilidade. A dessorção dos analitos da armadilha sólida para o cromatógrafo gasoso pode se realizada tanto pela eluição com solvente (dessorção com solvente) ou rápido aquecimento no injetor do cromatógrafo (dessorção térmica) (AGELOPOLUS; PICKETT, 1998; FRANCO, 2003).

Figura 6 – Sistema de extração de voláteis por *headspace* dinâmico



Fonte: Adaptado de: NOGUEIRA, 2002

Os detalhes do procedimento encontram-se nos tipos de armadilhas utilizadas, podendo ser criogênica ou com adsorventes. Armadilhas criogênicas utilizam recipientes refrigerados para a captura dos compostos voláteis, podendo coletar água junto com os compostos, o que torna as armadilhas com adsorventes mais convenientes. Adsorventes, como carvão ativo e vários polímeros porosos, Chromsorb[®] 101, 102 e 105, Porapak Q[®] (etilvinilbenzeno-divinilbenzeno) e Tenax[®] GC (óxido de 2,6-difenil-*p*-fenileno), podem ser usados para coletar compostos voláteis do *headspace*. Os mais utilizados são o Porapak Q[®] e Tenax[®], porque adsorvem os compostos voláteis ao mesmo tempo, que não adsorvem oxigênio, nitrogênio e principalmente vapor de água, que pode saturar a câmara de injeção, modificar os tempos de retenção, diminuir a vida útil da coluna e interferir nos espectros de massas (COLE, 1980; NOGUEIRA, 2002).

A concentração dos compostos voláteis em polímeros porosos tem sido largamente empregada na investigação de aromas em alimentos e bebidas. A fase de vapor imediatamente acima da amostra aproxima-se significativamente do aroma

percebido na matriz, desde que as condições de adsorção/dessorção sejam cuidadosamente padronizadas (FRANCO, 2003).

As principais vantagens desta abordagem encontram-se no fato dos extratos obtidos serem mais limpos, ou seja, conterem um número menor de compostos que naqueles obtidos por extração com solvente ou pelos métodos de destilação; na facilidade em dessorver os voláteis capturados em polímeros adsorventes porosos diretamente na porta da injeção do cromatógrafo a gás (dessorção térmica), além de acondicionar a amostra em recipientes de vários tamanhos de acordo com a necessidade. A técnica preenche ainda alguns requisitos convenientes tais como: requerer mínima manipulação da amostra, envolver isolamento e enriquecimento a temperatura ambiente, permitir otimização das condições de análise, evitar destruição da amostra, apresentar baixo custo e configuração simples. A principal desvantagem desta técnica é a contaminação por compostos de uma análise anterior (NOGUEIRA, 2002; FRANCO, 2003).

As técnicas de extração, como a extração líquido-líquido e os métodos de extração por destilação a vapor, exigem consumo de solventes orgânicos caros e tóxicos, maior tempo, e grandes volumes de solvente (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990).

3.7.3 Microextração em Fase Sólida (MEFS)

Esta é uma técnica, introduzida em 1990 por Arthur e Pawliszyn chamada de microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*). O método MEFS consiste na captura dos analitos em uma fibra capilar de sílica fundida quimicamente modificada, recoberta com uma película de material apropriado, com posterior dessorção térmica no injetor de um cromatógrafo. Uma vez introduzida no septo do recipiente contendo a amostra, a fibra de sílica é exposta ao meio onde ocorrerá a extração dos analitos (**Figura 7**, pág. 37) (NAVICKIENE et al., 2008).

A MEFS elimina os problemas associados com a dinâmica da extração em fase sólida, porém mantendo as suas vantagens. Os solventes são completamente eliminados e o tempo de extração pode ser reduzido a alguns minutos. Esta técnica foi desenvolvida como um meio rápido, barato e livre de solvente. As principais vantagens da MEFS são: sensibilidade, simplicidade elevada, pequeno volume de

amostra, e menor custo por análise. A técnica MEFS pode ser aplicada com sucesso para compostos polares e não-polares de amostras gasosas, líquidas ou sólidas, e pode ser facilmente combinada com vários instrumentos analíticos tais como: GC, GC-MS, HPLC, LC-MS e CG-O (GC-olfatometria) (PAWLISZYN, 1997; KATAOKA et al., 2000; WARDENCKI et al., 2004).

Outros aspectos relevantes da técnica MEFS são: reprodutibilidade, repetibilidade, estabilidade da fibra, bem como a possibilidade de determinações quantitativas. Desde 1992, MEFS tem sido amplamente utilizada para análise de amostras ambiental, alimentar, perfume, sabor, feromônios, produtos farmacêuticos, produto clínico, forenses e o monitoramento de reação (PAWLISZYN, 1997).

Além de fácil e rápido, este método é provavelmente o mais simples, permanecendo até hoje, com a técnica de preparação de amostra livre de solvente mais utilizada, principalmente em análises de campo. A principal desvantagem é a diluição da amostra acarretando na baixa sensibilidade da análise (NOGUEIRA, 2002).

A fase extrativa pode ser posicionada diretamente na fase líquida ou, no caso de amostras gasosas, em contato com o gás, ou ainda, em contato com o vapor em equilíbrio com a amostra líquida ou sólida. Após um certo período de tempo, necessário para que se estabeleça o equilíbrio entre as fases envolvidas, a fibra é reposicionada no interior da agulha (**Figura 7**, pág. 37). Em seguida, a seringa é levada a um cromatógrafo a gás, onde a fibra é introduzida no seu injetor, ficando exposta a ação do calor - os analitos são desorvidos e o processo de separação /quantificação então tem início (NAVICKIENE et al., 2008).

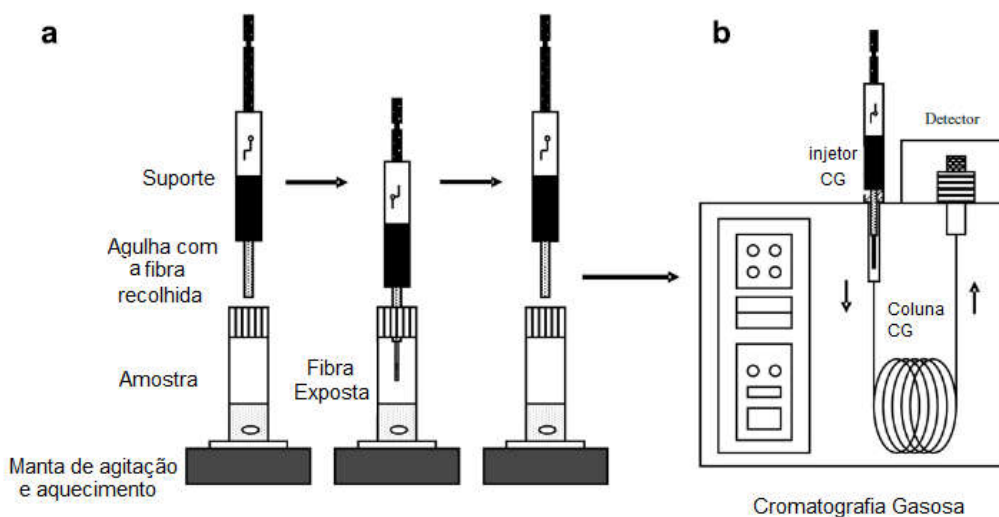
3.7.3.1 Seleção da Fibra

As fibras são utilizadas em MESF com a finalidade de adsorver os analitos de interesse. Os testes iniciais foram publicados no final dos anos 80, nos quais foram utilizadas pequenas seções de fibra ótica de sílica fundida, algumas recobertas com líquido polimérico ou com um material sólido adsorvente e outras sem qualquer recobrimento. O desenvolvimento da técnica se intensificou a partir da introdução da fibra no interior de uma agulha adaptada numa micro-seringa, o que facilitou bastante a coleta dos analitos e a introdução da amostra no injetor do cromatógrafo (NAVICKIENE et al., 2008).

Em geral, a extração de voláteis é bem sucedida, quando a polaridade da fibra corresponde à polaridade do analito, isto é, fibras não-polares para analitos não-polares, e fibras polares para analitos polares. Este princípio também se aplica em cromatografia a gás, onde analitos polares e não polares requerem colunas com a mesma polaridade para análise (MANI, 1999).

As espessuras dos recobrimentos das fibras comerciais variam de 7 μ m a 100 μ m e seus volumes de 0,03 μ L a 0,7 μ L. As fibras são frágeis, razão pela qual o dispositivo mostrado na **Figura 7** foi projetado para que ela possa ser retraída para dentro do tubo hipodérmico durante operações que possam danificá-las, tais como a de transporte e as de perfurar o septo do frasco de amostra e o do injetor do cromatógrafo (VALENTI; AUGUSTO, 2000). As fibras disponíveis comercialmente para CG estão relacionadas na **Tabela 2** (pág. 38).

Figura 7 - (a) Processo de Microextração em Fase Sólida (b) Dessorção térmica da fibra de Microextração em fase Sólida (MEFS).



Fonte: Adaptado de Cuevas-Glory, et al. 2007.

Tabela 2 – Tipos de fibras de MEFS disponíveis comercialmente.

Tipo	Composição Química	Lf/ μm^*	ΔT ($^{\circ}\text{C}$)	Aplicação sugerida
Não-polares	Não-polares Polidimetilsiloxano (PDMS)	100, 30, 7	200-270 $^{\circ}\text{C}$	Basicamente para compostos apolares. É possível usar com polares.
Polares	Poliacrilato (PA)	85	220-310 $^{\circ}\text{C}$	Mediamente a altamente polares, como fenóis, pesticidas organofosforados.
	Carbowax/divinilbenzeno (CW-DVB)	65	200-260 $^{\circ}\text{C}$	Cetonas, álcoois. Voláteis de média a alta polaridade.
Bipolares	PDMS-DVB	65	200-270 $^{\circ}\text{C}$	Voláteis de não voláteis de baixa a alta polaridade.
	Carboxen-PDMS	75	--	Voláteis

*Espessura do recobrimento da fibra de MEFS

Fonte: (Supelco, Bellefonte PA)

3.7.3.2 Otimização da extração por MEFS

Numa extração por MEFS as moléculas do analito têm de se deslocar da matriz e penetrar no recobrimento e, para isto, resistências a transferências de massa devem ser vencidas, até que se estabeleça um equilíbrio de partição do analito, entre a fibra e o meio que a envolve (VALENTI; AUGUSTO, 2000).

A extração ocorre mergulhando-se a seção recoberta na amostra (modo direto), ou no seu *headspace*. No modo extração direta, a fibra é inserida diretamente na amostra e os analitos são transportados da amostra para a fase extratora. Para acelerar o processo, emprega-se agitação mecânica a fim de transportar os analitos do meio da solução para a vizinhança da fibra (LANÇAS, 2004).

No modo *headspace*, os analitos têm de ser transportados através da barreira de ar antes de atingirem o recobrimento da fibra. Essa modificação serve, principalmente, para proteger a fibra de possíveis danos provocados por interferentes de elevada massa molecular ou baixa volatilidade presentes na amostra, como materiais húmicos (amostras ambientais) e proteínas (amostras biológicas (LANÇAS, 2004)

Após o processo de extração, a fibra é retirada da amostra e inserida no injetor do cromatógrafo gasoso, onde os analitos são termicamente desorvidos sob fluxo de gás de arraste e carregados para a coluna cromatográfica. As fibras extraem pequenas quantidades de analito, o que facilita sua desorção e subsequente separação cromatográfica. A **figura 7** ilustra o procedimento utilizado na extração por MEFS (VALENTI; AUGUSTO, 2000).

Em MEFS, a quantidade de substância extraída para a fibra depende não só da polaridade e da espessura da fase estacionária, mas também do tempo gasto no processo e da concentração dos analitos presentes na amostra. A Extração de analitos é melhorada por agitação, adição de sal à amostra, alterando o pH, e o aumento da temperatura. O tempo de extração é principalmente determinado pela velocidade de agitação e do coeficiente de partição do analito entre o revestimento da fibra e a matriz da amostra (PAWLISZYN, 1999; KATAOKA et al, 2000).

A agitação magnética é comumente utilizada, pois esse processo acelera a transferência do analito da amostra matriz para o revestimento da fibra, no entanto uma agitação muito rápida pode causar uma mudança no tempo de equilíbrio e levar a pobre precisão na medição. A eficácia da extração é também melhorada através da adição de sais solúveis a amostra, tais como: cloreto de sódio, hidrogenocarbonato de sódio, carbonato de potássio ou sulfato de amônio. Se necessário a amostra é acidificada para a extração de analitos ácidos e é tornada alcalina, para a extração de analitos básicos (PAWLISZYN, 1999; KATAOKA et al., 2000).

A fim de, aumentar a concentração dos analitos na fase gasosa, a amostra pode ser aquecida. Um aumento na temperatura de extração provoca um aumento da taxa de extração, e simultaneamente, uma diminuição da constante de distribuição. Por conseguinte, uma adequada temperatura que proporcione uma satisfatória sensibilidade e taxa de extração deve ser usado. Outro ponto importante é que o tamanho do frasco e o volume da amostra devem permanecer constantes em todas as amostras durante a análise por MEFS. Geralmente, o frasco é cheio até a metade da sua capacidade. A extração do analito é melhorada quando o espaço superior é reduzido ao mínimo, no entanto o volume de *headspace* mínimo é limitado pelo comprimento da fibra (CUEVAS-GLORY et al., 2007).

3.7.3.3 Otimização da dessorção

Uma dessorção eficiente dos analitos no orifício de injetor do CG depende da volatilidade dos mesmos, da espessura do revestimento da fibra, do tempo de injeção, da temperatura do injetor, e exposição da fibra no injetor. A fibra precisa ser exposta imediatamente após a agulha ser introduzida no injetor (PAWLISZYN, 1999; KATAOKA et al., 2000). Injetores “split/splitless” devem ser operados no modo “splitless” para evitar a perda de compostos voláteis extraídos. O tempo de dessorção depende da temperatura do injetor e a taxa de fluxo linear em torno da fibra. Para conseguir a reprodutibilidade constante, condições adequadas de extração do analito e de dessorção da fibra são essenciais (PAWLISZYN, 1999; KATAOKA et al., 2000).

3.8 Cromatografia gasosa na Separação e Identificação dos Compostos Voláteis

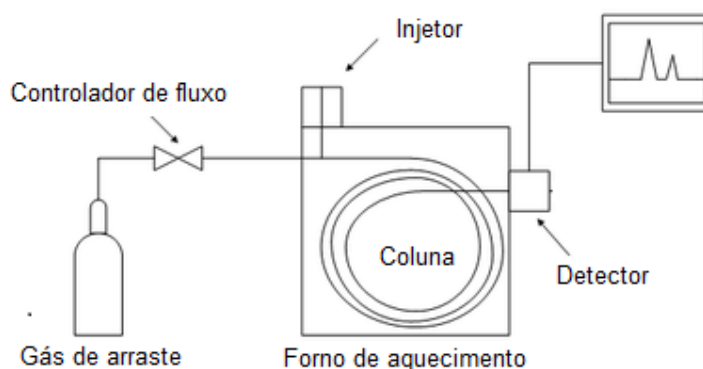
O desenvolvimento e aplicação de metodologias para determinação da composição química dos compostos voláteis é uma tarefa desafiadora. O método para a Separação de compostos voláteis deve ser simples, rápido, eficiente e de baixo custo, compreendendo uma única etapa que separe os componentes voláteis da matriz da amostra ao mesmo tempo em que concentra-os com a menor manipulação possível (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

Os voláteis podem ser separados utilizando-se técnicas cromatográficas, principalmente pela cromatografia gasosa. Nesta técnica, a separação baseia-se na diferença de distribuição das substâncias de uma amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa). A amostra, por meio de um sistema de injeção, é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. O uso de temperaturas adequadas no local de injeção da amostra e na coluna de separação possibilita a vaporização dessas substâncias que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por tempos determinados e chegam a saída da coluna em tempos diferenciados (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006). A **Figura 8** (pág. 41) apresenta os componentes de um cromatógrafo gasoso.

A cromatografia gasosa é uma técnica que tem como vantagens a rapidez, um poder de resolução excelente, alta sensibilidade, podendo analisar até 10^{-12} g, além de operar com pequenas quantidades de amostra (CECCHI, 2003). A

separação dos componentes da amostra é efetuada na coluna cromatográfica, a qual deve ser devidamente escolhida, levando-se em consideração a dimensão, o tipo e a quantidade de suporte sólido que compõe a fase estacionária, pois com a seleção inadequada dessas condições será mais difícil obter resultados satisfatórios mesmo com equipamentos modernos e sofisticados (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

Figura 8 – Esquema geral dos componentes de um cromatógrafo gasoso.



Fonte: Adaptado de <http://farmacognosiaws.no.comunidades.net>.

O injetor tem a função de vaporizar a amostra, que deve ocorrer de forma rápida e completa, sem decompor e fracionar a amostra. A quantidade de amostra injetada não deve ultrapassar a capacidade da coluna, que por sua vez, depende da quantidade da fase líquida estacionária (CECCHI, 2003).

Os injetores mais usados para análises traços são os tipos split/splitless (no modo splitless), on column e Programmed Temperature Vaporizer (PTV), envolvendo o efeito de focalização da amostra na entrada da coluna capilar (GROB, 1994). No entanto, a melhor opção para análise de compostos voláteis termolábeis é o injetor cool oncolumn, no qual se evita a decomposição térmica ou a discriminação de compostos com pontos de ebulição elevados, pois permite a introdução direta da amostra na coluna cromatográfica sem vaporização prévia (THOMAZINI; FRANCO, 2000). Com esse tipo de injeção, a totalidade da amostra injetada é introduzida na coluna, evitando o emprego de conexões que poderiam introduzir artefatos ou diminuir a resolução da separação cromatográfica (BASTOS, 1996).

Os detectores estão situados na saída da coluna de separação, sua função é medir a quantidade dos componentes individuais separados, presentes na corrente do gás de arraste, que elui da coluna cromatográfica. O sinal de saída do detector é enviado a um sistema de dados que finalmente traça um gráfico denominado cromatograma. O tipo de detector utilizado em uma análise depende de fatores tais como a natureza dos componentes separados e o nível da concentração a ser medido, sendo que para a análise de voláteis um dos mais utilizados é o Detector de Ionização de Chama (DIC) (AQUINO NETO; NUNES, 2003).

A identificação dos compostos voláteis passou por um grande avanço, que foi iniciado com a associação de cromatógrafos gasosos a espectrômetros de massa (CG-EM). A união dessas duas poderosas técnicas de análise química introduziu uma ferramenta eficaz na separação e na identificação de compostos provenientes de misturas complexas. Os espectrômetros de massas fornecem boa estabilidade e sensibilidade para análises de compostos voláteis (THOMAZINI; FRANCO, 2000).

As características dos espectros de massas são usadas na identificação de uma grande variedade de compostos orgânicos, onde as relações massa/carga obtidas podem ser transformadas em informação estrutural a partir de estudos sobre mecanismos de fragmentação dos compostos (MCLAFFERTY, 1994). Sistemas modernos de biblioteca auxiliam na identificação dos compostos desconhecidos através de comparação com espectros padrões, armazenados na memória do computador (JANZANTTI, 2004).

As moléculas no estado gasoso são ionizadas em regiões de alto vácuo (10⁻⁸ atm) produzindo íons e fragmentos de íons que são encaminhados para um analisador de massa/carga e finalmente coletados pelo detector. A representação dos resultados constitui o espectro de massas, o qual demonstra a distribuição das espécies iônicas e suas abundâncias relativas. Cada composto, dependendo de sua estrutura química, passa por fragmentações particulares, gerando um espectro de massas característico, que pode ser utilizado como uma “impressão digital” daquele composto (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

As características dos espectros de massa são usadas na identificação de uma grande variedade de compostos orgânicos. Esses sistemas (CG-EM) possuem um banco de dados, armazenado na memória do computador que auxiliam na identificação do composto desconhecido através da comparação do mesmo com espectros obtidos de padrões puros (bibliotecas com substâncias puras e seus

respectivos íons). Mesmo assim, é necessário o conhecimento das características de retenção quando compostos diferentes apresentam espectros de massas semelhantes. Por isto, como citado pela International Office of the FlavorIndustry (IOFI), apenas os dados de cromatografia gasosa – espectrometria de massas (CG-EM), muitas vezes podem ser insatisfatórios para uma identificação efetiva do composto. Assim, em alguns casos, informações adicionais obtidas por espectroscopia no infravermelho e por ressonância magnética nuclear ainda são necessárias (MCLAFFERTY, 1994).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de frutos infestados

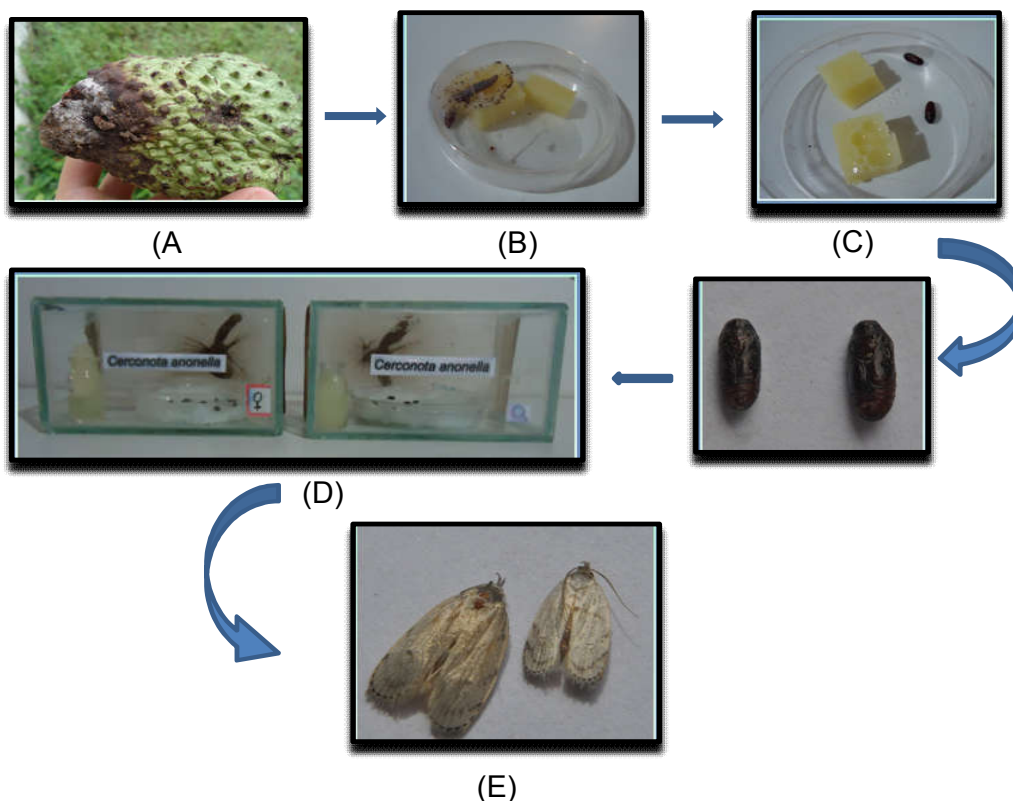
Frutos de *Annona muricata* e *Annona squamosa*, infestados por *C. anonella* foram coletados em pomares isentos da aplicação de agrotóxicos, localizados nos municípios de Coruripe (alt: 5 m, W, long S 36° 10' 34", lat 10° 8' 1"), e Igaci (alt: 260m, W, long S 036° 37' 54,4", lat 09° 32' 53,1"), Alagoas e levados ao laboratório de Ecologia Química (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e mantidos em gaiola até a retirada das lagartas.

4.2 Obtenção de insetos

Lagartas de *C. anonella* foram retiradas dos frutos com auxílio de pinças entomológicas, transferidas para placas de Petri 90 x 15 mm poliestireno (plástico) transparente e mantidas em dieta artificial a base de farelo de trigo e germe de trigo, descrita por Da Silva et al. (2006) até a obtenção de pupas, cuja sexagem foi realizada de acordo com a descrição de Freitas et al., 2007 e mantidas dentro de gaiolas de vidro (14,8 cm x 30 cm x 30 cm), em sala climatizada, com fotoperíodo invertido de 12 horas de fotofase e 12 horas de escotofase. Durante esse período foi oferecido, aos insetos separados por sexo, algodão embebido com solução de sacarose (10%) como alimento, o qual era trocado a cada dois dias. A **Figura 9** (pág. 45) apresenta a sequência deste processo.

Os adultos foram empregados em experimentos subsequentes: as fêmeas foram utilizadas para a obtenção de extratos e bioensaios, enquanto os machos, foram utilizados, nos bioensaios empregando os extratos de fêmeas e compostos sintéticos. As lagartas de primeiro e segundo instares não eram consideradas, dada a sua rápida mortalidade em condições de laboratório.

Figura 9- Sequência do processo de obtenção e manutenção de insetos de *Cerconota anonella* em laboratório, onde: (A): fruto brocado, (B) lagarta retirada do fruto em dieta artificial (C) pupas de *Cerconota anonella* (D) gaiolas de vidro contendo pupas de *Cerconota anonella* separadas por sexo e (E) adultos de *Cerconota anonella*.



Fonte: Autora, 2012

4.3 Obtenção de extratos de glândulas abdominais de *C. anonella*

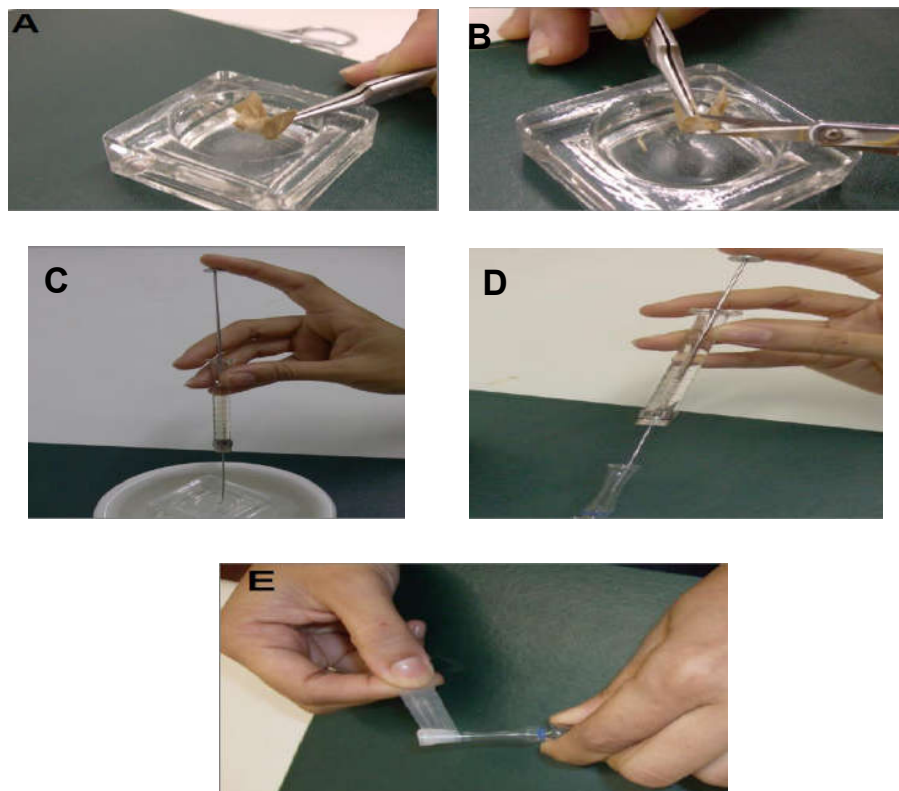
Os extratos considerados para identificação do feromônio sexual de *C. anonella*, são aqueles provenientes da glândula abdominal de fêmeas em chamamento, visto que, conforme a literatura (VEGLIANTE e HASENFUSS, 2011), a glândula abdominal de fêmeas de lepidópteros está envolvida na produção e liberação de atraentes sexuais para machos co-específicos.

Ao exibirem o comportamento de chamamento descrito por Da Silva et al. (2006), dez fêmeas virgens com 2-3 dias de idade foram retiradas das gaiolas de manutenção e levadas ao freezer (-5°C) localizado no Laboratório de Ecologia Química do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB-UFAL), durante 5 minutos, para fins de imobilização e de manutenção das condições fisiológicas da glândula

Materiais e métodos*Edjane Vieira Pires*

produtora do feromônio. Findo este tempo, as fêmeas foram retiradas do freezer e, com auxílio de um bisturi, o sétimo e oitavo segmentos abdominais de cada fêmea foram cortados e mantidos em uma cuba de vidro, onde permaneceram em contato com 100 μ L de hexano por cerca de 30 segundos. Durante todo o processo de preparação dos extratos, a cuba foi mantida imersa em gelo a fim de evitar a evaporação do solvente. Um esquema deste processo pode ser visto na **Figura 10**. Os constituintes voláteis foram extraídos em hexano e diclorometano. Um esquema deste processo pode ser visto na **Figura 10**.

Figura 10- Esquema representativo da extração da glândula produtora do feromônio, onde: (A) fêmea de *Cerconota anonella*, (B) corte na região abdominal, (C) adição de solvente, (D) transferência para ampola de vidro e (E) selagem.

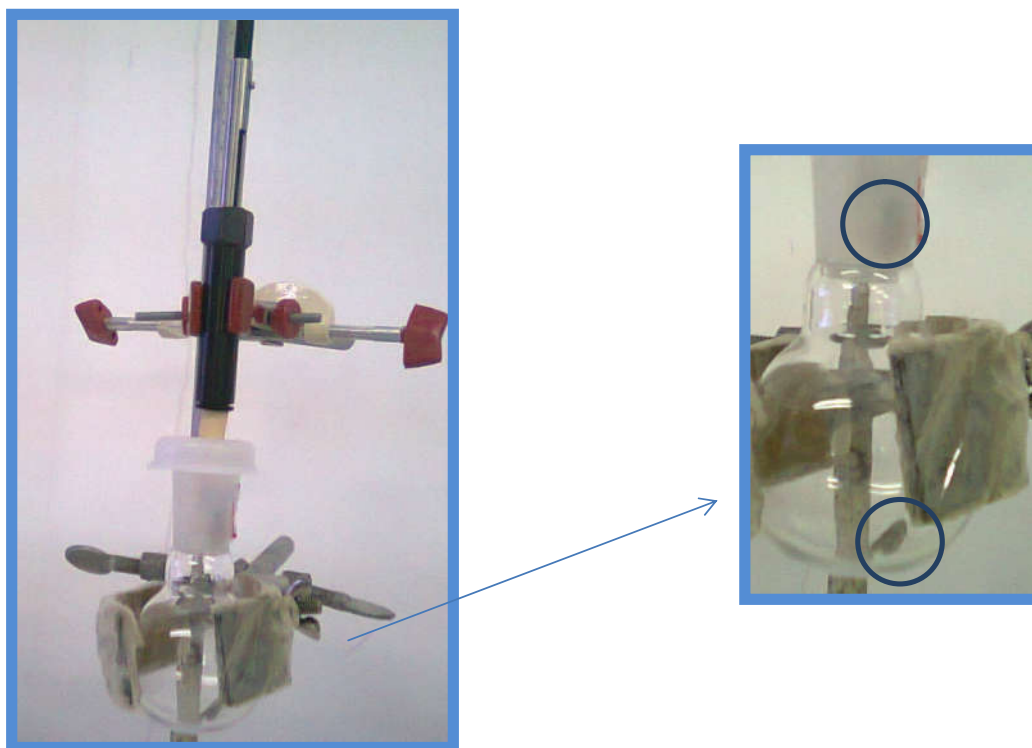


Fonte: Adaptado de Mendonça, (2009).

4.4 Microextração em fase sólida com fêmeas de *Cerconota anonella*

Em um balão de 50 mL foram colocadas duas fêmeas virgens de *C. anonella* com idade de 2-3 dias. O experimento foi realizado, durante a escotofase por um período de 60 min, divididos igualmente entre adaptação do inseto e a extração dos Compostos Orgânicos Voláteis (COVs). Uma fibra de MEFS, coberta com 100 µm de Polidimetilsiloxano-PDMS (Supelco®) - material adsorvente - foi exposta no “headspace” por 30 minutos, como pode ser visto na **Figura 11**. Decorrido esse tempo, a fibra foi recolhida e em seguida inserida no injetor do CG-EM, por 4 minutos à 250°C para completa dessorção térmica dos compostos voláteis liberados pelas fêmeas.

Figura 11 – Procedimento de extração dos COVs liberados pela fêmea de *Cerconota anonella* por Microextração em fase Sólida (MEFS).



Fonte: Autora, 2012

4.5 Obtenção dos compostos padrões empregados nos experimentos

As identidades dos compostos a seguir estão sendo resguardadas devido a um sigilo de patente. Os compostos padrões, a saber: **OOI**, **OOII**, **OAL** e **OA** foram obtidos comercialmente (Sigma-Aldrich®). Os compostos: **OALI**, **OAL**, **OM** e **OMI** foram sintetizados.

4.5.1 Síntese do OAL

Em um balão de fundo redondo de 50 mL colocou-se 300 mg (1,1 mmol) de **OOI** e 10 mL de diclorometano (CHCl_2) seco para sua dissolução. Em seguida, 300 mg (1,39 mmol) de Clorocromato de Piridínio (PCC), foi acrescentado à solução anterior e a reação teve início, sendo realizada sob agitação constante e monitorada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), de modo que, após 12 horas a temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 30 mL de hexano, levando a formação de um precipitado, o qual foi removido por filtração. O material filtrado foi concentrado em evaporador rotatório de baixa pressão e o resíduo resultante foi então submetido à cromatografia em sílica gel, utilizando uma mistura hexano:clorofórmio (95:5) como eluente, para obtenção do **OAL** puro (87,67%). Pelo mesmo procedimento foi obtido **OALI** a partir do **OOII**. Os compostos de interesse foram isolados e, submetidos às análises de RMN ^1H , IV e CG-MS para verificação da estrutura química do produto de interesse.

4.5.2 Síntese do OM

Em um balão de fundo redondo de 100 mL colocou-se 10 mL (0,44 mmol) de piridina, ao qual foram adicionados 1 g (3,69 mmol) de **OOI**, seguido da adição de 50 mL (2,23 mmol) de anidrido acético recém destilado. A mistura permaneceu em agitação magnética por 24 horas a temperatura ambiente. A mistura reacional foi recebida em gelo picado em um béquer e, em seguida, foram adicionados 100 mL de ácido clorídrico 1mol.L^{-1} , o qual permaneceu em contato com a mistura reacional por aproximadamente uma hora, para a completa hidrólise do anidrido acético. A solução resultante foi submetida à extração com clorofórmio (3 x 100mL). A solução clorofórmica foi lavada com solução de ácido clorídrico $0,1\text{mol.L}^{-1}$ (3x100mL) para eliminar o excesso de piridina e depois lavada novamente com água destilada (3x100mL). O excesso de ácido foi removido pela lavagem com bicarbonato de

sódio a 5% (3x100mL) seguindo-se de lavagem com água (3x100mL) e posterior secagem com Na₂SO₄ e remoção do solvente em evaporador rotatório a pressão reduzida. O material resultante foi submetido a cromatografia em sílica gel, utilizando como eluente hexano:clorofórmio (**90:10**), obtendo-se o produto com um rendimento de 78%.

Este mesmo procedimento foi empregado para a obtenção do, OMI a partir do OOI. Os compostos de interesse foram isolados e, submetidos a análises de RMN ¹H, IV e CG-MS, para comprovação da estrutura química do produto de interesse.

4.6 Análise por cromatografia Gasosa (CG)

Para as análises por cromatografia gasosa, os extratos da glândula abdominal, de fêmeas de *C. anonella*, foram concentrados à 10 µL (1 fêmea-equivalente). Alíquotas de 1µL dos extratos foram injetados em Cromatógrafo Gasoso com Detector de Ionização em Chamas (CG/DIC), QP2010 plus, usando coluna RTX-5 (30 m, 0,25 mm de diâmetro interno; 0,25 µm diâmetro do filme; Restek) e nitrogênio como gás de arraste. Utilizou-se para análise dos extratos, uma programação cuja temperatura inicial do forno era de 50 °C com uma velocidade de aquecimento de 9 °C/min até 240 °C, com modo de injeção “splitless” e injetor e detector DIC operando com temperaturas de 200 e 250°C, respectivamente.

4.7 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)

Utilizando como parâmetro os resultados obtidos das análises por CG-DIC, foram realizadas análises em um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG/EM), QP2010 plus, com ionização por impacto eletrônico de 70eV, utilizando-se coluna RTX-5 (30 m, 0,25 mm de diâmetro do filme; Shimadzu) usando Hélio como gás de arraste. As análises dos extratos de glândula foram efetuadas com uma programação, em que a temperatura inicial do forno de 50 °C com uma velocidade de aquecimento de 9 °C/min até 240 °C, modo de injeção “splitless”, com injetor e detector DIC com temperatura de 200 °C e 250 °C, respectivamente.

4.8 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensionais foram obtidos em espectrômetro busbustker *AVANCE* 400 operando na frequência 400MHz para ^1H do Laboratório de RMN do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. Em todos os casos, o referencial interno foi o Tetrametilsilano (TMS) utilizando-se como solvente CDCl_3 . Os dados de RMN coletados foram processados usando-se o programa SPIN WORKS e TOP SPIN visando à obtenção dos espectros unidimensionais. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm e as constantes de acoplamento em Hertz.

4.9 Análise por Infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram obtidos em aparelho Varian 660-IR/FT-IR pela técnica de Reflectância Total Atenuada (ATR), para amostras líquidas na Central Analítica do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. Em amostras sólidas fizemos a aquisição dos espectros com pastilhas de KBr, utilizando-se um intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.10 Identificação e quantificação dos compostos

Os compostos presentes no extrato da glândula abdominal foram identificados pelo estudo comparativo dos espectros de massas da biblioteca NIST08 e pelo cálculo do índice de Kovats com base de dados disponível em www.pherobase.com.

Para calcular o índice de Kovats foi realizada co-injeção com uma série homóloga de *n*-alcanos (Sigma-Aldrich $\text{C}_7\text{-C}_{30}$) e para quantificar, foi adicionada as amostras de extração da glândula 1 μL de 3-penten-2-ona como padrão interno, na concentração de 0,17109 mg mL^{-1} .

4.11 Bioensaios

4.11.1 Formulação e Impregnação dos tratamentos em septos de borracha

Em todos os bioensaios de campo, Septos de borracha (0,7cmØ), os quais serviram como substrato, foram impregnados com as amostra teste um dia (1) antes da realização dos experimentos de campo. Aos extratos hexânicos abdominais, bem como às soluções dos compostos e solventes foram adicionados 0,2 mg de 2,6-di-*tert*-butil-*p*-cresol (BHT) como antioxidante, conforme metodologia descrita na literatura (PARRA-PEDRAZZOLI 2006). Para impregnação, os tratamentos foram colocados em contato com o septo de borracha no interior de tubos do tipo eppendorf, os quais foram fechados e mantidos em freezer (-5°C) até a sua utilização, quando foram transportados, em caixa térmica, até as áreas de teste.

4.11.2 Bioensaios com extratos de fêmeas de *C. anonella*

4.11.2.1 Bioensaios em laboratório

Os bioensaios foram realizados em sala com fotoperíodo invertido de 12:12h (C:E), à temperatura de 21,46±0,73 °C durante a escotofase (período que ocorre a liberação do feromônio, segundo Da Silva et al, 2006) e umidade relativa de 84,00±3,87%, sendo oferecida uma intensidade de iluminação de 3,5 W/m², durante as 12 horas de fotofase. Uma lâmpada vermelha de 15W foi usada para facilitar as observações durante as 12h da escotofase. Para tanto, 5 (cinco) machos virgens de *C. anonella*, com idade entre 2-3 dias, marcados com tinta colorida atóxica sem odor, foram colocados em câmaras de vidro (14,8cm x 30cm x 20,3cm), sem fluxo de ar. Em seguida, discos de papel de filtro (Whatman ®, nº 01, 20mm Ø) foram impregnados com 10 µL de extratos da glândula abdominal de fêmeas virgens, em chamamento, obtidos com hexano e diclorometano.

Nos bioensaios com fêmeas virgens vivas, as mesmas foram mantidas em gaiola de polietileno (7 cm Ø), representando assim o tratamento-testemunha. Sendo colocada uma fêmea virgem na gaiola, que ficava fixada no superior da câmara de bioensaios. Discos de papel impregnados com hexano, bem como discos limpos também foram testados servindo como tratamento controle e branco,

respectivamente. O comportamento exibido pelos machos foi observado ininterruptamente durante 10 minutos conforme descrito por Da Silva et al. (2006).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado. Todos os experimentos foram conduzidos utilizando 10 (dez) repetições por tratamento e as seguintes variáveis, baseadas no comportamento de cômte exibido por machos, foram consideradas e quantificadas: (1) vibração de asas, (2) vôo curto e rápido, (3) toque na fonte e (4) tentativa de cópula.

Para os bioensaios envolvendo extratos da glândula de fêmeas virgens, foram realizados cinco tratamentos-teste (1:extrato hexânico de abdome, 2:extrato em diclorometano de abdome, 3:hexano (controle), 4:diclorometano (controle) e 5: 1 tratamento testemunha (fêmea viva). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P<0,05$) e expostos na figura abaixo.

4.11.2.2 Bioensaios no campo

Os testes em campo foram realizados nos mesmos pomares onde os frutos foram coletados, durante a safra, no mês de julho de 2011 e 2012 em dias ensolarados. Os experimentos com extratos de fêmeas de *C. anonella* foram conduzidos nos pomares de *A. squamosa*, ($80\pm 10\%$ U.R e $27\pm 0,3^{\circ}\text{C}$), sendo escolhida uma área de 0,3 ha contendo 50 plantas com espaçamento de 4m x 4m e altura de 3 metros aproximadamente.

Estes bioensaios foram conduzidos em pomar de *A. squamosa*, em plantas frutificadas. Neste bioensaio, foram distribuídas armadilhas tipo Delta[®] conforme relatado por Parra-Pedrazzoli (2006), no terço médio de cada árvore, equidistantes pelo menos 8 metros cada, em linhas e plantas alternadas. Cada uma, continha 1 (uma) gaiola (40mmø x 65mm altura) com 3 fêmeas virgens no seu interior ou um septo de borracha impregnado com extratos hexânicos abdominais de fêmeas virgens (20 fêmeas/200 µL). Após (sete) dias fazia-se a leitura para avaliar o numero de machos capturados, bem como, a recasualização das armadilhas. Sendo estas etapas realizadas durante três semanas consecutivas. Armadilhas contendo: septo de borracha impregnado somente com hexano (controle), e sem tratamento (branco) também foram distribuídas.

Em todos os experimentos a normalidade dos dados das variáveis foi verificada por meio do teste de Lilliefors a 5% de probabilidade. Os dados da variável, insetos capturados foram transformados utilizando-se raiz ($x + 0,5$). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey e Scott-Knott (Bioensaios com soluções dos compostos padrões sintéticos em laboratório) a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa SAEG (UFV, 2007).

Nos bioensaios envolvendo a avaliação da atratividade de extratos abdominais de fêmeas, foram utilizadas 6 (seis) armadilhas por tratamento, num total de 24 (vinte e quatro), a saber: 1) gaiola com 3 fêmeas vivas; 2) extrato hexânico de abdome (20 fêmeas/200 μL); 3) hexano (controle) e 4) armadilha sem tratamento (branco). Foram realizadas 6 (seis) repetições, e a variável observada foi o número de machos capturados por armadilha. Os resultados obtidos destes bioensaios foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.11.3 Bioensaios com soluções dos compostos padrões sintéticos

4.11.3.1 Bioensaios em laboratório

Para realização dos bioensaios, os compostos sintéticos foram diluídos em hexano em duas concentrações principais: $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ e 1 mg mL^{-1} . Estes experimentos foram realizados em sala com fotoperíodo invertido de 12 horas, à temperatura de $21,46 \pm 0,73 \text{ }^\circ\text{C}$ durante a escotofase e umidade relativa de $84,00 \pm 3,87\%$. Para tanto, 1 (um) macho de *C. anonella* com idade entre 2-3 dias foi colocado em câmaras de vidro (14,8cm x 30cm x 20,3cm), sem fluxo de ar. Em seguida, discos de papel de filtro (Whitman®, nº 01) com diâmetro de 20 mm foram impregnados com 10 μL das soluções e da mesma forma, o comportamento exibido pelos machos foi observado ininterruptamente durante 10 minutos conforme descrito por Da Silva et al. (2006). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado. Todos os experimentos foram conduzidos utilizando 10 (dez) repetições por tratamento e as seguintes variáveis, baseadas no comportamento de cômte exibido por machos, foram consideradas e quantificadas: (1) vibração de asas, (2) vôo curto e rápido, (3) toque na fonte e (4) tentativa de cópula.

Também foram realizados bioensaios com as misturas de compostos nas proporções estabelecidas por CG-EM (**Tabela 3**). Tal como no item anterior, bioensaios com fêmeas virgens vivas penduradas em gaiola de polietileno serviram como tratamento-testemunha e discos de papel impregnados com hexano, bem como discos limpos também foram testados servindo como tratamento controle e branco, respectivamente. Para cada tratamento (**Tabela 3**, pág. 55) foram realizados dez repetições.

Tabela 3 – Descrição dos tratamentos utilizados nos testes com soluções dos compostos sintéticos

Tratamento	Concentrações
1: OAL	0,1mg/mL
2:OM	0,1mg/mL
3: OOI	0,1mg/mL
4:OA	0,1mg/mL
5:OAL	1mg/mL
6:OM	1mg/mL
7:OOI	1mg/mL
8:OA	1mg/mL
9:Mistura 1 ^I	1mg/mL
10:mistura 2 ^{II}	0,1mg/mL
11:Fêmea virgem	1 fêmea
12:Branco ^{III}	-
13: hexano ^{IV}	-
14:Mistura 3 ^V	1mg/mL
15:Mistura 4 ^{VI}	0,1mg/mL
16: Mistura 5 ^{VII}	1mg/mL
17: Mistura 6 ^{VIII}	0,1mg/mL

^IMistura quaternária dos compostos saturados [1(OM):3 (OAL):5(OOI):5(OA)]

^{II}Mistura quaternária dos compostos saturados [1(OM):3 (OAL):5(OOI):5(OA)]

^{III}Disco de papel limpo

^{IV}Disco de papel impregnado com hexano

^VMistura Ternária dos compostos insaturados [1(OMI):3 (OALI):5(OOII)]

^{VI}Mistura Ternária dos compostos insaturados [1(OMI):3 (OALI):5(OOII)]

^{VII}Mistura Ternária dos compostos saturados [1(OM):3 (OAL):5(OOL)]

^{VIII}Mistura Ternária dos compostos saturados [1(OM):3 (OAL):5(OOL)]

4.11.3.2 Bioensaios de campo

Estes experimentos foram conduzidos no mesmo pomar onde os frutos de *A. muricata* foram coletados, cujo valor de precipitação no mês de julho era de 204,2 milímetros (Secretaria de Estado do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos, 2012). A realização dos bioensaios de campo pode ocorrer em pomar de *A. muricata* ou *A. squamosa*, uma vez que, de acordo com Silva, (2012) não há diferença na composição química dos Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) dessas duas espécies.

A umidade relativa apresentava-se em cerca de 80% e a temperatura média de $27 \pm 0,3^\circ \text{C}$. Uma área de 1 ha foi escolhida, com espaçamento de 4m x 4m e altura de 3m aproximadamente e as armadilhas foram distribuídas sob as mesmas condições do bioensaio anterior. O volume da amostra impregnada foi de 500 μL , na concentração de 1 mg mL^{-1} .

Nos bioensaios envolvendo as soluções dos compostos sintéticos, na concentração de 1 mg mL^{-1} , foram distribuídas 5 (cinco) armadilhas por tratamento, num total de 45 (quarenta e cinco), a saber: 1) (OM); 2) (OAI); 3) (OOI); 4) (OA); 5) Mistura 1 [1(OM):3(OAL):5 (OOI):5 (OA)]; 6) Mistura 2 [1(OM):3 (OAL):5(OOI)]; 7) Fêmea Viva (testemunha); 8) Hexano grau HPLC (controle) e 9) Armadilha sem tratamento. Foram realizadas 5 (cinco) repetições e a variável observada foi o número de machos capturados por armadilha. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P < 0,05$) e expostos na figura abaixo. A cada 7 (sete) dias eram feitas as leituras do número de machos capturados por tratamento e a racasualização das armadilhas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

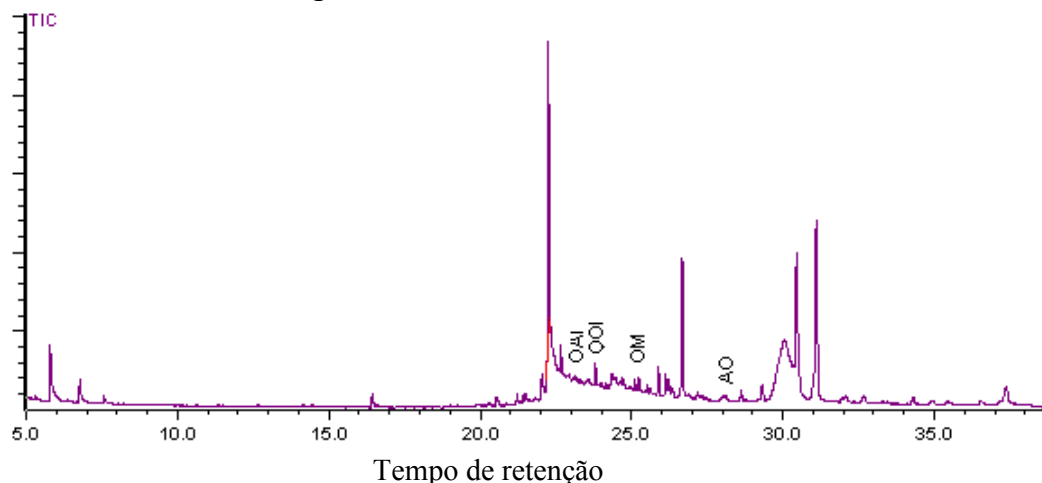
5.1 Análises Químicas do extrato da glândula de *Cerconota anonella*

O extrato da glândula abdominal apresentou uma gama de compostos, dos quais os mais promissores como componentes das misturas feromonais liberadas por lepidópteros (HEDIN et al., 1986; SUBCHEV M et al., 2000; FRANCKE et al., 2004; NAKA et al., 2006;), foram escolhidos para estudos posteriores relacionados a identificação da atividade biológica destes componentes. A identidade destes compostos está designada, por siglas, objetivando a proteção da identidade dos mesmos, visto que, esses compostos estão sob sigilo de patente. Deste modo, as análises químicas dos extratos de abdome de *C. anonella* foram norteadas no sentido de se detectar a presença dos seguintes compostos: (OOI), (OM), (OA) e (OAL) nas amostras analisadas (Tabela 4, pág. 57; Figura 12, pág. 58).

Tabela 4 – Caracterização química do extrato da glândula abdominal de *Cerconota anonella*

Tempo de retenção (min)	Composto	Concentração mg mL ⁻¹
24305	OOI	0,001593
23072	OAL	0,014425
24706	OMI	0,006813
25246	OM	0,012527
28109	OA	0,012491
29317	OAI	0,025436

Figura 12 – Distribuição dos compostos: (OOI), (OM), (OA) e (OAL), em extrato hexânico da glândula abdominal de *Cerconota anonella*.



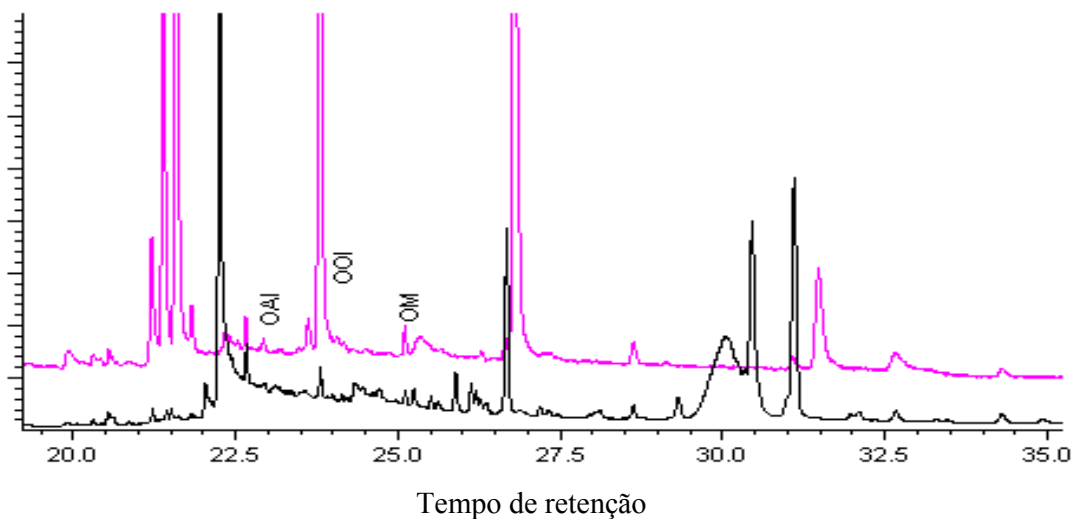
Fonte: Autora, 2012.

A presença de OOI, OA, OAL e OM nos extratos hexânicos de abdômes de fêmeas de *C. anonella*, foi confirmada através de comparação dos tempos de retenção com compostos padrões bem como co-eluição com os mesmos.

5.2 Micro-extração em fase sólida com fêmeas de *C. anonella*

Os resultados das análises por Micro-Extração em Fase Sólida (MEFS) corroboram com os resultados obtidos pelo emprego da técnica de Extração por Solvente (ES), conforme pode ser visto na **Figura 13** (pág. 59), que apresenta, dentre outros compostos, os compostos de interesse, (OOI), (OM), e (OAL), detectados anteriormente nos extratos obtidos por ES. Em outros trabalhos, como de Millar, et al., (2008) e Beek, et al., (2005), também fez-se uso da Micro-extração em Fase Sólida, com a intenção de otimizar o resultado da extração dos COVs oriundos das glândulas abdominais. Sabe-se, no entanto, que uma limitação, deste recurso é a não possibilidade de armazenamento, o que torna impossível a avaliação comportamental do extrato obtido. Neste trabalho, realizaram-se os bioensaios comportamentais de atração sexual, com os extratos obtidos por extração com solvente. O que aparentemente não traz prejuízos, dada a similaridade entre os perfis cromatográficos dos extratos obtidos pelo emprego das duas técnicas de extração.

Figura 13– Análise comparativa entre Microextração em fase Sólida (MEFS) e Extração com solvente (ES), para extração dos prováveis COVs feromonais.



Fonte: Autora, 2012.

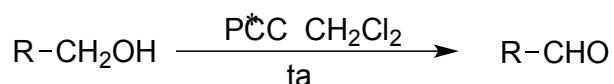
5.3 Preparação dos compostos identificados nos extratos de abdome de fêmeas de *Cerconota anonella*.

Para comprovar a identidade dos compostos identificados por CG-EM como possíveis candidatos da mistura feromonal liberada por fêmeas de *C. anonella*, através de análises químicas e de ensaios comportamentais, os compostos OAL, OALI, OM e OMI foram sintetizados. As **Figuras 14** e **15** (pág. 59) mostram as equações que representam a reação de obtenção do OAL e OALI.

Os dados espectrais de Ressonância Magnética de Hidrogênio (RMN H^1), Infra-Vermelho (I.V) e Espectrometria de Massas (EM), foram decisivos na confirmação estrutural do produto reacional formado.

5.3.1 OAL

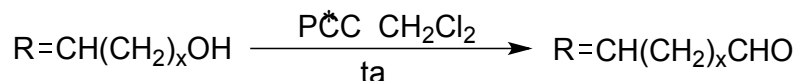
Figura14: Esquema reacional da síntese do OAL



*Cloro Cromato de Piridina

5.3.2 OALI

Figura 15: Esquema reacional síntese do OALI



*Cloro Cromato de Piridina

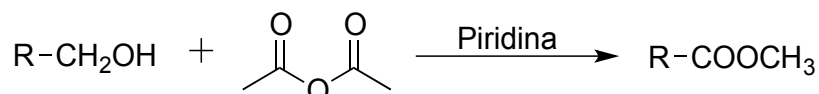
O percentual de rendimento ao final da reação de formação do OAL e OALI (87,67 e 85,02%) foi superior ao observado na literatura de referência (ISLAM, et al., 2007), cujo rendimento foi de 67%. Os principais fatores analíticos observados foram o sinal correspondente a hidrogênio aldeídico e carbonila por RMN H^1 e I.V, respectivamente. O OALI tem além destes sinais, aqueles correspondentes a dupla ligação. Os espectros de massas foram ainda analisados, configurando-se como uma ferramenta decisiva para confirmações estruturais.

No caso do OMI, obsevou-se sinais que são atribuídos à dupla ligação. Os rendimentos obtidos na síntese do **OM** e **OMI** foram de 78 e 91% respectivamente. Os dados de RMN H^1 , I.V e EM colaboraram para a certificação da obtenção do produto desejado, também nesta etapa. Foi constatado o sinal característico da metoxila por RMN H^1 , bem como da carbonila de éster no espectro de infravermelho,

representando informações definitivas de ocorrência da reação. As **Figuras 16 e 17** (pág. 60) mostram as equações representativas da síntese do OM e OMI realizada em laboratório.

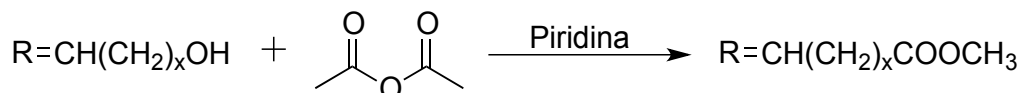
5.3.3 OM

Figura 16 – Esquema reacional síntese do OM



5.3.4 OMI

Figura 17– Esquema reacional síntese do OMI



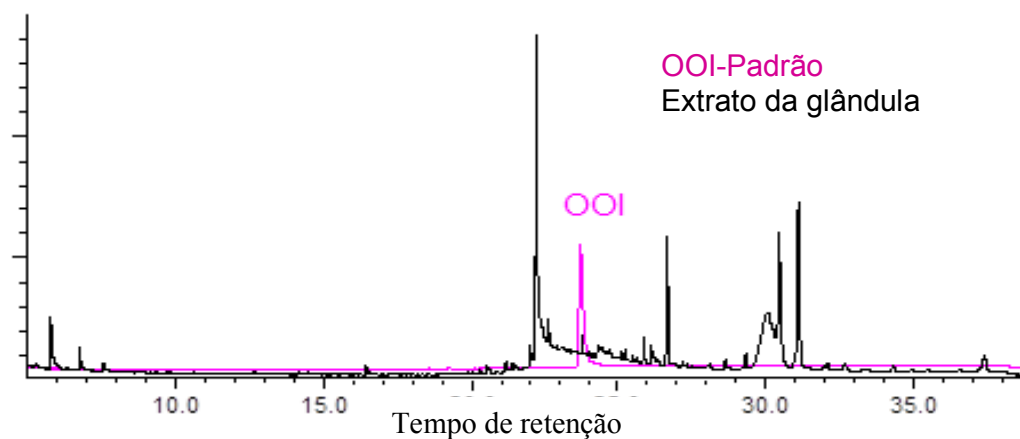
5.4 Análise dos espectros de massas dos compostos de interesse presentes no extrato de glândula de *C. anonella*

A intensidade do pico do íon molecular para álcoois é muito pequena e muitas vezes ausente no espectro de massas obtido por impacto eletrônico. Um fragmento considerado característico para esta classe de compostos é o que corresponde a perda de uma molécula de água (M-H₂O). Esse fragmento é mais intenso em álcoois de cadeia longa (PAVIA, LAMPAMAN, KRIZ, 1996).

Um fragmento muito importante em álcoois e aldeídos contendo quatro ou mais átomos de carbono é derivado da perda simultânea de uma molécula de água e uma de eteno (M-46), a qual ocorre através do rearranjo de McLafferty sofrido pelo íon molecular.

A análise do extrato da glândula mostrou a presença de álcoois, a qual foi comprovada através de comparação do tempo de retenção (24:30 min), coeluição e espectro de massas com composto padrão comercial (ALDRICH®) (**Figura 18**, pág. 61).

Figura 18 – Comprovação pelo tempo de retenção, da presença do (OOI) no extrato de glândula de *Cerconota anonella*.

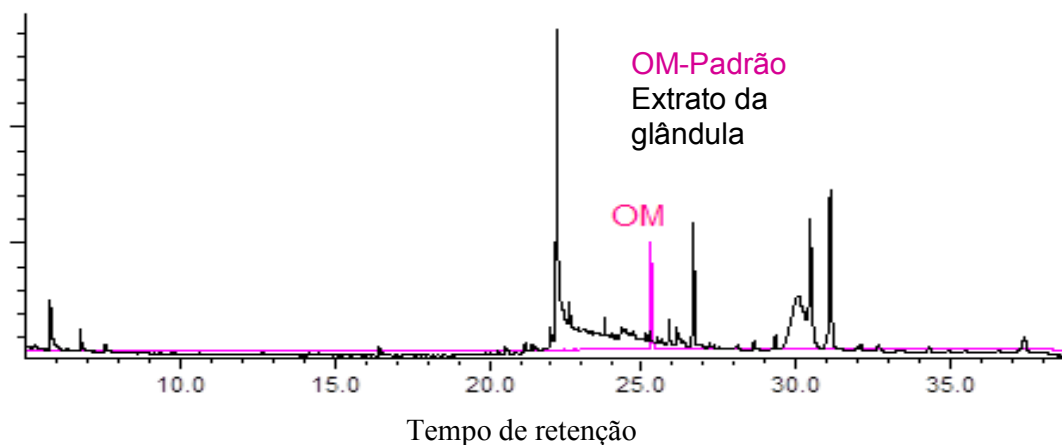


Fonte: Autora, 2012

O espectro de massas do OOI no extrato do abdome de fêmeas de *C. anonella* apresenta os picos de fragmentação característicos (M-46) e (M-18) com intensidade de apenas 4.83 e 3.70, respectivamente. A semelhança espectral deste álcool com um alcano está de acordo com Ferreira et al., (2001) que afirmam ser comum os espectros de álcoois se assemelharem aos de seus alcanos quando se emprega a técnica de impacto eletrônico para ionização das moléculas.

O éster metílico, OM, foi comprovadamente detectado no extrato feromonal com tempo de retenção 25:24 min, como mostra a **Figura 19** (pág. 62). Os fragmentos m/e 31, referente ao íon metoxila (OCH_3^+), (M-31), e $m/z = 74$, resultante de rearranjo de Mc Lafferty estão presentes no espectro da amostra e no produto sintético acetilado em baixíssima intensidade relativa 1.32, 0.47 e 1.27 (para o éster na amostra) respectivamente. Apesar dos dados de RMN H^1 e IV que comprovam a ocorrência da acetilação, os fragmentos de $m/z = 269$ (M-29), característico de ésteres metílicos saturados e $m/z = 74$, resultante de rearranjo de Mc Lafferty, não foram detectados.

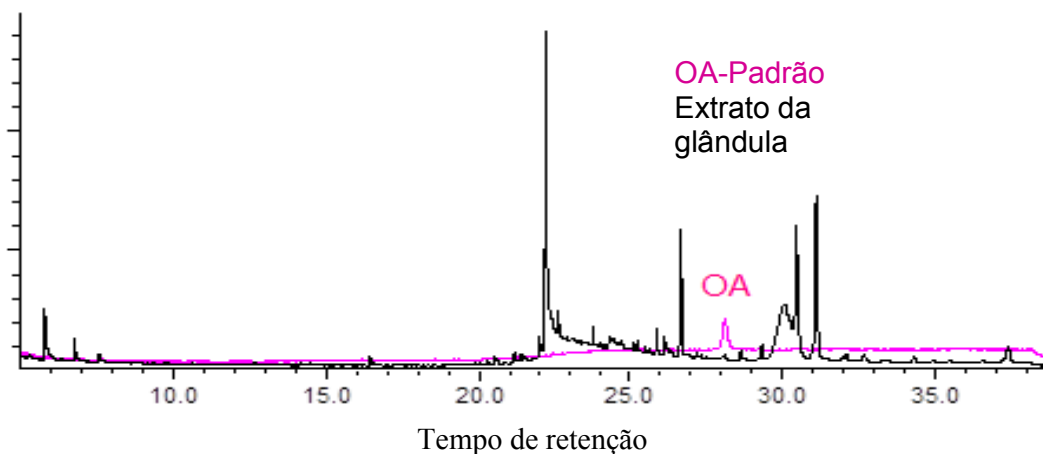
Figura 19 – Comprovação pelo tempo de retenção, da presença do OM no extrato de glândula de *Cerconota anonella*.



Fonte: Autora., 2012

O composto OA está presente com tempo de retenção 28.10 min (**Figura 20**, pág 63) e possui espectro de massas coerente quando comparado ao espectro do padrão comercial (ALDRICH®). Os fragmentos considerados diagnósticos de ácidos como $m/z=60$ proveniente de rearranjo de Mc Lafferty e $m/z=73$ resultante da clivagem entre os carbonos beta e gama ocorrem em pequeníssima intensidade relativa (2.22 e 3.31, respectivamente).

Figura 20 – Comprovação pelo tempo de retenção, da presença do OA extrato de glândula de *Cerconota anonella*

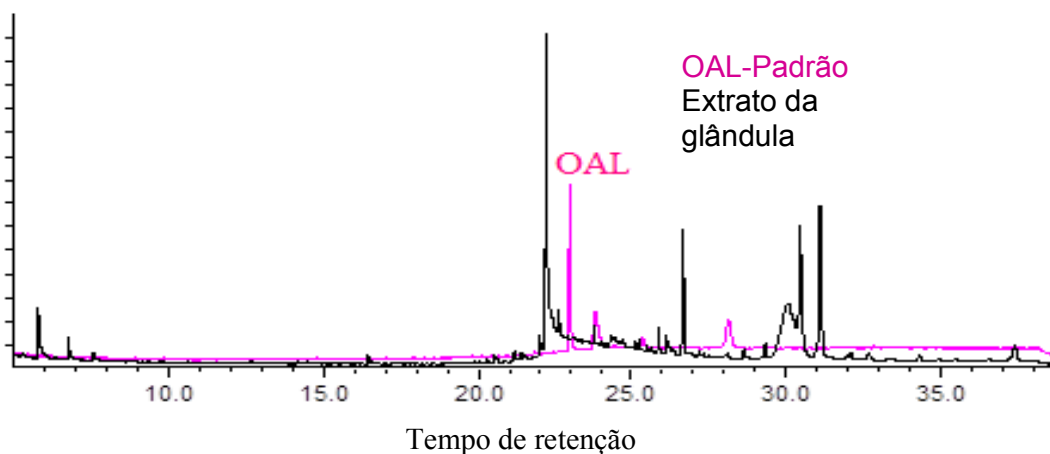


Fonte: Autora., 2012

O composto OAL, tempo de retenção 23:07, foi detectado na amostra de extração (**Figura 21**, pág. 63) e confirmado por comparação de tempo de retenção,

coeluição com padrão sintético e análise do espectro de massas. Com o estudo do espectro de massas, pode-se perceber a presença de fragmentos considerados característicos desta classe. Dentre estes, podemos perceber o m/z 224 resultante de um rearranjo de Mc Lafferty, o m/z 225 resultante de uma β -clivagem e m/z 250, que caracteriza perda de uma molécula de água. As abundâncias relativas dos fragmentos acima foram de 3.10, 3.43 e 0.24, respectivamente.

Figura 21 – Comprovação pelo tempo de retenção, da presença do OAL no extrato de glândula de *Cerconota anonella*



Fonte: Autora, 2012

No extrato feromonal também detectou-se a presença dos compostos olefínicos, OMI e OAI com tempos de retenção igual a 24.70 e 29.31 min.

Uma vez tendo-se comprovado a presença de todos os compostos acima, pela comparação do tempo de retenção e por coeluição, foram realizados os bioensaios necessários. Sendo estes realizados de acordo com a **Tabela 3** (pág. 55) da metodologia.

5.5 Bioensaios com extratos de fêmeas de *C. anonella*

5.5.1 Comportamento de machos diante de extratos de fêmeas de *Cerconota anonella* em laboratório.

Machos de *C. anonella* responderam, de forma diferenciada, comparando os extratos do abdome de fêmeas virgens obtidos em diferentes solventes, conforme pode ser visto na **Tabela 5** (pág. 64). Observou-se ainda que, as respostas de

Resultados e discussões*Edjane Vieira Pires*

machos foram maiores para os extratos hexânicos e que o mesmo eliciu respostas estatisticamente semelhantes ao tratamento testemunha (fêmeas virgens vivas), quando as variáveis foram Antenação, Agitação de asas e Toque na fonte, caracterizando os extratos como atraentes.

Provavelmente a tentativa de cópula não está ligada, apenas ao estímulo químico, isto é, a exposição do macho ao extrato hexânico das glândulas abdominais. Fatores visuais também podem ter contribuído para a diferença comportamental envolvendo esta variável. Estudos realizados por Papke, et al. (2005) constataram que as pistas visuais influenciam a escolha de machos de *Colias eurytheme* (Boisduval, 1852) (Lepidoptera:Pieridae) pelas fêmeas co-específicas á curta distância.

Tabela 5 – Resposta de machos de *Cerconota anonella* diante de extratos do abdome de fêmeas virgens obtidos com hexano e diclorometano

Tratamento	Variáveis			
	Antenação	Agitação de asas	Toque na fonte	Tentativa de cópula
1	13,00±3,63a	16,60±4,98a	10,80±3,67a	1,80±1,56b
2	1,40±0,74b	0,20±0,20b	0,00±0,00b	0,00±0,00b
3	0,80±0,48b	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,00b
4	1,80±0,96b	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,00b
5	17,80±4,44a	15,40±3,26a	11,00±4,26a	6,20±1,56a

Tratamentos: 1:Abdome macerado com hexano; 2: Abdome macerado com diclorometano; 3: Hexano; 4: Diclorometano; 5: Fêmea viva. As médias (±erro padrão) com letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (p<0.05).

Com isso comprova-se que não é conveniente o uso de diclorometano para extração dos compostos orgânicos voláteis da glândula abdominal de *C. anonella*.

5.5.2 Avaliação da atratividade dos extratos de abdome de fêmeas de *C. anonella* na captura de machos em armadilhas de campo

As armadilhas, contendo como atraente os extratos hexânicos da glândula abdominal, funcionaram positivamente na captura de machos desta espécie. Além disso, foi observado que a captura não diferiu estatisticamente para fêmeas vivas e extrato hexânico de abdome (**Tabela 6**, pág.65).

Tabela 6 – Média de captura de machos de *Cerconota anonella* em pomar de *A. squamosa*

Tratamento	Insetos capturados
1	2,00±0,47a
2	1,55±0,64a
3	0,00±0,00b
4	0,00±0,00b

Tratamentos: 1: Fêmea viva, 2: extrato hexânico de abdome, 3) Hexano grau HPLC (controle) e 4) Armadilha sem tratamento (branco). As médias (\pm erro padrão) de mesma letra nas colunas não diferiram entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade ($p < 0.05$).

Com esses dados de comprovação da atividade atraente do extrato hexânico em campo é que se partiu para o estudo de identificação dos componentes do feromônio sexual de *C. anonella*.

5.6 Bioensaios com soluções dos compostos padrões sintéticos

5.6.1 Avaliação dos compostos sintéticos identificados nos extratos de fêmeas de *Cerconota anonella* na atração de machos co-específicos em ensaios de laboratório

A sequência associada ao comportamento de corte exibido por machos de *C. anonella* diante de soluções contendo a mistura de compostos sintéticos foi semelhante ao que eles exibem na presença de fêmeas vivas em chamamento conforme descrito por Da Silva et al. (2006), isto é, movimentação das antenas, vibração de asas, voo normal e em zigzague, localização da pluma de odores, voo contra o vento seguindo a trilha de odores, localização da fonte de feromônio,

pouso nessa fonte ou em áreas adjacentes, caminhada e movimentação de asas até encontrar a fonte de odor.

De maneira geral, essa sequência de comportamento iniciava-se dois minutos após a introdução do macho na câmara de bioensaios e contato com os voláteis. Em nenhuma situação foi observada a tentativa de cópula, mas em certas amostras sintéticas houve o pouso na fonte de odor, como mostra a **Tabela 7** (pág. 67). De acordo com os dados estatísticos pode-se considerar que a concentração das misturas 1 e 2, constituídas pelos tratamentos 9 e 10 não influenciam na resposta dos machos a esses tratamentos, ou seja, ambas não diferem entre si, pelo menos em duas das três variáveis observadas. Pelo observado, não existe diferença significativa entre os tratamentos 9, 10, 11 e 14, envolvendo, a variável, agitação de asas. A análise relacionada a variável toque na fonte de odor, demonstrou que as misturas 3 e 5 apresentaram resultados comparáveis ao tratamento correspondente a fêmea virgem, isto indica que possivelmente a mistura feromonal não inclui o precursor biossintético, uma vez que essas misturas são ternárias e compostas por [1(OMI):3 (OALI):5(OOII)] e [1(OM):3 (OAL):5(OOI)]. Além disso, essa comparação permitiu concluir que a concentração melhor, para teste das misturas é a de 1 (um) miligrama por mililitros.

A mistura ternária dos compostos insaturados [1(OMI):3 (OALI):5(OOII)], não diferiu estatisticamente quando comparada a fêmea virgem em todas as variáveis observadas, evidenciando que provavelmente são os compostos insaturados que influenciam na atratividade dos machos de *C. anonella*. Os componentes químicos, quando testados individualmente, apresentaram respostas semelhantes nos machos de *C. anonella*. Além disso, apresentaram respostas geralmente inferiores quando comparadas às misturas dos compostos, o que corrobora com as evidências de sinergismo da maioria dos feromônios sexual de lepidópteros.

Tabela 7 – Médias obtidas nos ensaios de laboratório empregando os componentes do feromônio de *Cerconota anonella*

Tratamentos	Agitação asas	Voo direto fonte de odor	Toque na fonte de odor
1:OAL 0,1mg/mL	1,30±0,97b	0,20±0,13b	0,20±0,20b
2:OM 0,1mg/mL	3,10±2,00b	1,00±0,55b	0,00±0,00b
3: OOI 0,1mg/mL	1,90±1,36b	0,20±0,13b	0,00±0,00b
4:OA 0,1mg/mL	3,50±2,38b	2,30±1,04a	0,40±0,26a
5:OAL 1mg/mL	3,80±2,08b	0,30±0,30b	0,00±0,00b
6:OM 1mg/mL	0,90±0,31b	0,10±0,10b	0,00±0,00b
7:OOI 1mg/mL	6,50±5,72b	0,10±0,10b	0,00±0,00b
8:OA 1mg/mL	3,90±1,94b	1,10±0,60b	0,10±0,10b
9:Mistura 1 ^I	17,20±5,54a	1,00±0,25b	0,10±0,10b
10:Mistura 2 ^{II}	18,40±7,36a	2,70±1,42a	0,10±0,10b
11:Fêmea virgem	29,60±4,97 a	3,10±0,86 a	0,40±0,16a
12:Branco ^{III}	0,20±0,13 b	0,00±0,00 b	0,00±0,00b
13:hexano ^{IV}	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b	0,00±0,00b
14:Mistura 3 ^V	19,60±6,19 a	4,90±1,53 a	0,60±0,26a
15:Mistura 4 ^{VI}	11,40±7,48 b	0,60±0,40 b	0,00±0,00b
16: Mistura 5 ^{VII}	5,40±2,34 b	0,90±0,43 b	0,90±0,43a
17: Mistura 6 ^{VIII}	6,60±4,43 b	0,40±0,22 b	0,00±0,00b

As médias (±erro padrão) com letras diferentes diferem entre si, nas colunas, pelo teste de Scott-Knott.

^IMistura quaternária dos compostos saturados [1(OM):3 (OAL):5(OOI):5(OA)] na concentração de 1mg/mL

^{II}Mistura quaternária dos compostos saturados [1(OM):3 (OAL):5(OOI):5(OA)] na concentração de 0,1mg/mL

^{III}Disco de papel limpo

^{IV}Disco de papel impregnado com hexano

^VMistura Ternária dos compostos insaturados [1(OMI):3 (OALI):5(OOII)] na concentração de 1mg/mL

^{VI}Mistura Ternária dos compostos insaturados [1(OMI):3 (OALI):5(OOII)] na concentração de 0,1mg/mL

^{VII}Mistura Ternária dos compostos saturados [1(OM):3 (OAL):5(OOI):] na concentração de 1mg/mL

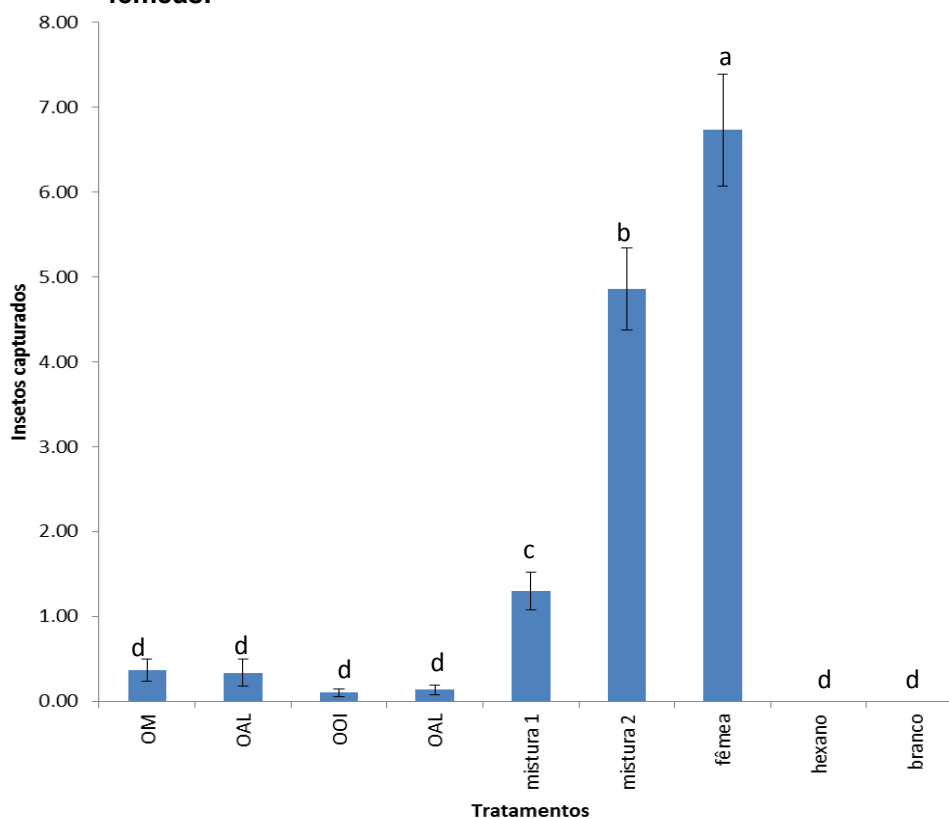
^{VIII}Mistura Ternária dos compostos saturados [1(OM):3 (OAL):5(OOI):] na concentração de 0,1mg/mL

5.6.2 Avaliação dos compostos sintéticos identificados nos extratos de fêmeas de *Cerconota anonella* na atração de machos co-específicos em ensaios de campo

Nos bioensaios realizados em condições de campo, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos referentes aos compostos individuais designados pelas siglas OM, OAL, OOI, OA, quando estes foram comparados ao tratamento envolvendo hexano e branco (armadilha sem nada). Os machos de *C. anonella* foram atraídos pelas armadilhas contendo as misturas 1[1(OM):3 (OAL):5(OOI):5(OA)] e 2 [1(OM):3 (OAL):5(OOI)]. (**Figura 22**, pág. 69). Porém, dentre as amostras avaliadas, observou-se que a mistura que não continha o componente OA apresentou melhor resultado de atratividade. Estruturalmente o componente OA é semelhante aos precursores biossintéticos, estando coerente com

relatos de literatura, que consideram a ausência dos precursores biossintéticos na composição do feromônio sexual de lepidópteros (SUBCHEV, et al 2000; MILLAR, et al 2008; YAMAKAWA, et al 2009; LEE, et al 2005). Sendo assim, pode-se considerar que a presença do OA pode interferir negativamente, na intensidade da resposta á mistura de compostos que constitui o feromônio sexual de *C. anonella*.

Figura 22 –Número Médio (media \pm erro padrão) de machos de *Cerconota anonella* capturados diante de compostos sintéticos identificados nos extratos de fêmeas.



Fonte: Autora, 2013

Vários fatores podem influenciar resultados de captura em campo, tais como, umidade, temperatura, época, densidade populacional, precipitação, idade das plantas, entre outros. Carde e Baker (1984) e Kondo e Tanaka (1994), verificaram no campo que quando a proporção de fêmeas é maior que a dos machos, elas competem com o feromônio liberado nas armadilhas, diminuindo, desta forma, sua eficiência por causa da menor captura de machos. A diferença no tempo de emergência entre fêmeas e machos podem ter como resultado um maior número de fêmeas, nestas condições os machos são mais atraídos pelas fêmeas para o acasalamento, do que pelas armadilhas de feromônio (IBARRA, 2006).

6 CONCLUSÕES

- Os extratos de fêmeas virgens de *C. anonella*, obtidos em hexano, são mais atrativos para machos co-específicos;
- Em testes de campo, a atração de machos desta espécie para extratos hexânicos de fêmeas foi semelhante a observada para as armadilhas contendo fêmeas virgens vivas;
- As análises químicas dos extratos hexânicos por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) revelaram, dentre outros, a presença de quatro compostos, os quais receberam as seguintes siglas: (OOI), (OM), (OA) e (OAL);
- As soluções dos compostos individuais testadas em campo, não eliciaram respostas de atração em machos, entretanto, as misturas ternária e quaternária destes compostos saturados, eliciaram atração em machos de *C. anonella*, semelhante ao que foi observado para os extratos hexânicos de fêmeas virgens;
- Com relação aos bioensaios laboratoriais percebeu-se que compostos químicos sintéticos, testados individualmente, eliciaram resposta inferior em machos de *C. anonella*, quando comparados as misturas testadas, que por sua vez, apresentaram resultados comparáveis aos observados nos bioensaios com os extratos da glândula abdominal de fêmeas virgens;
- Em testes de campo, dentre as misturas de compostos testadas, a mistura ternária representada pelos compostos [1(OM):3 (OAL):5(OOI)] foi a que eliciou uma atratividade mais pronunciada em machos;
- Em testes de laboratório a mistura dos compostos insaturados [1(OMI):3 (OALI):5(OOII)] foi a que mostrou melhor resultado para as variáveis observadas;
- Pelo exposto, conclui-se que provavelmente, os compostos identificados e testados são os componentes do feromônio sexual de *C. anonella*.

7 PESPECTIVAS

1. Realizar novos bioensaios, em campo com as misturas que apresentaram resultados mais promissores nos ensaios de laboratório e de campo.
2. Realizar análises de Cromatografia Gasosa Acoplada à Eletroantenografia (CG-EAD), com os compostos trabalhados nesta tese e suas misturas, para confirmação do que foi observado em bioensaios aqui trabalhados.
3. Que os resultados obtidos sejam utilizados como subsidio para novos estudos que visem a aplicação dos mesmos no Manejo Integrado de Pragas. Estes novos estudos inclui: testar variáveis que podem influenciar na eficiência da mistura feromonal, tais como, altura, tipo, distância e cor das armadilhas, temperatura, umidade, período da safra e entre safra, clima, variedade das espécies em campo, tamanho da área de aplicação do feromônio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFORD, D.V. Observations on the specificity of pheromone-baited traps for *Cydia funebrana* (Treitschke) (Lepidoptera: Tortricidae). **Bulletin of Entomological Research**. v. 68 p.97-103. 1978.

AGELOPOLUS, N. G.; PICKETT, J. A. Headspace analysis in chemical ecology: effects of different sampling methods on ratios of volatile compounds present in headspace samples. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, p. 1161-1172, 1998.

ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; McLAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v.62, p.504-40, 1999.

ALBRE, J., et al. Sex Pheromone evolution Is associated with differential regulation of the same desaturase gene in Two genera of leafroller Moths. **PLoS Genetics**, v. 8, 2012, doi:10.1371/journal.pgen.1002489.

ANDO T, et al. Lepidopteran sex pheromones. **Top Curr Chem**, v. 239, p. 51–91, 2004.

AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D.; PADOVANI, R. M. Síntese das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidantes. **Nutrição**, v.14, p. 71-78, 2003.

ARAYA, H.; Studies on annonaceous tetrahydrofuranic acetogenins from *Annona squamosa* L. seeds. **Bulletin of National Institute for Agro-Environmental Sciences**, v. 23, p. 77-149, 2004.

ARAUJO, J.F; et al. Instruções técnicas para o cultivo da pinha (*Annona squamosa* L.) Salvador: **EBDA**, (Circular técnica, 7). 1999

Referências bibliográficas*Edjane Vieira Pires*

ARN, H., et al. List of sex pheromones of lepidoptera and related attractants. 123 pp. Montfavet, France, **International Organization for Biological and Integrated Control**, 1992.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

BACKER, T.C e CARDÉ, R.T. Courtship behavior of the oriental fruit moth (*Grapholita molesta*): Experimental analysis and consideration of the role of sexual selection in the evolution of courtship pheromones in the Lepidoptera. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 72, n. 1, p. 173-188, 1979.

BARTELL, R. J. Mechanisms of communication disruption by pheromone in the control of Lepidoptera: a review. **Physiology Entomology**. v. 7, p. 353-364, 1982.

BASTOS, D.H.M. **Compostos voláteis de méis de eucalipto e laranja**. 1996. 148f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos Unicamp, Campinas-SP, 1996.

BATISTA-PEREIRA., et al. Comportamento de Chamamento de *Thyrintina arnobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae) em *Psidium guajava*, *Eucalyptus grandis* e em Dieta Artificial. **Neotropical Entomology** v. 33, p. 021-028, 2004.

BEEK, T.A., et al. Partial elucidation of Trichogramma putative sex pheromone at trace levels by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry studies. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 311–321, 2005.

BIRKETT MA., et al. New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 9329-9334, 2000.

Referências bibliográficas*Edjane Vieira Pires*

BITTENCOURT, M. A. L., et al. Biologia, danos e táticas de controle da broca-da-polpa das anonáceas. **Bahia Agrícola**, v. 8, p. 16-17, 2007.

BLEICHER e MELO. Graviola. Fitossanidade. Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza,CE). (**Frutas do Brasil**, 20), p.22-39. 2002.

BLOMQUIST, G. J. e VOGT, R. G. **Biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles – introduction and overview**. Elsevier Academic Press, p. 3-18, 2003.

BRAGA-SOBRINHO, R. et al. Occurrence and damage of soursop pests in northeast Brazil. **CropProtection**, v.18, p.539-541, 1999.

BRAGA-SOBRINHO, R. Potencial de exploração de Anonaceas no Nordeste do Brasil. Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza,CE). **17º Semana Internacional da Fruticultura**, 2010

BRITO E. A. **flutuação populacional e avaliação de táticas de controle sobre a broca do fruto das anonáceas *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Oecophoridae)**. 2010. 52f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA. 2010.

BROGLIO-MICHELETTI., et al. Controle de *Cerconota anonella* (SEPP.) (Lep.: Oecophoridae) e de *Bephratelloide spomorum* (Fab.) (Hym.: Eurytomidae) em frutos de graviola (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol. 23, p. 722-725, 2001.

BROGLIO-MICHELETTI,S.M.F e BERTI-FILHO, E. Controle de *Cerconota anonella* em pomar de gravioleira. **Scientia Agrícola**, v. 57, p. 557-559, 2000.

BUSTILLO, A.E., PEÑA, J.E. Biology and control of the Annona fruit borer *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Oecophoridae). **Fruits**, v. 47, p. 81-84, 1992.

BUTENANDT, A., et al. Über den Sexual- Lockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*. **Reindarstellung und Konstitution**. Z. Naturforsch. v. 14, p. 283-284, 1959.

CALZAVARA e MÜLLER. Fruticultura tropical: a gravioleira *Annona muricata* L. Belém: **EMBRAPA** (Belém do Pará). p.15-18. 1987. (Documento, 47).

CARDE RT e BAKER T.C. Sexual communication with pheromones. In: Bell WJ, Carde RT (eds) Chemical ecology of insects. **Chapman e Hall**, New York, p. 355–383, 1984.

CARDOSO, J. E. Graviola: fitossanidade. Brasília: Embrapa. (**Frutas do Brasil**, 20). p. 47. 2002.

CARVALHO, D. R. **Comparação de métodos de monitoramento e controle do Bicho-Furão, *Ecdytiliophya aurantiana* (Lima, 1927) (Lepidoptera, Tortricidade), em citros**. 2003. 54f. Dissertação de mestrado. ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba-SP. 2003.

CECCHI, H.M. **Cromatografia Gasosa. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2ª ed., Campinas-SP. Editora Unicamp, p.201, 2003,

CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. 4 ed. Cambridge: Cambridge University Press, p. 770, 1998.

CIENFUEGOS, F e VITSMAN, D. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro, Editora Interciencia. p.225. 2000.

COLLINS, H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1 ed. Campinas-SP. Editora Unicamp, p. 17-42, 2006.

Referências bibliográficas*Edjane Vieira Pires*

CONNER WE. 'Un chant dappelamoureux': acoustic communication in moths. **Journal of Experimental Biology**, v. 202, p. 1711–1723, 1999.

CORK, A., et al. Female sex pheromone of brinjal fruit and shoot borer, *Leucinodes orbonalis*: trap optimization and application in IPM trials. **Bulletin of Entomological Research**, v. 93, p.107–113, 2003.

CHOI M.Y., et al. Pheromone biosynthetic pathways in the moths *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa assulta*. Insect **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 1353-1359, 2002.

COLE, R. A. The use of porous polymer for the collection of plant volatile. **Journal Science and Food Agriculture**, v. 31, p. 1242-1249, 1980.

CORK, A. et al. Development of PVC-resin-controlled release formulation for pheromones and use in mating disruption of yellow rice stem borer, *Scirpophya gaincertulas*. **Crop Protection**, v. 27, p. 248–255, 2008.

CUEVAS-GLORY, L.F. et al. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1032–1043, 2007.

CUSSON, M.; MCNEIL, J. N. Involvement of juvenil hormone in the regulation of pheromone release activities in a moth. **Science**, v. 243, p. 210-212, 1989.

DA COSTA, J.G e KIILL, L.H.P. Floral biology and reproductive system of *Annona squamosa* L. (Annonaceae) in Petrolina-PE, Brasil. **Ciência rural**, v. 33, p. 851-856, 2003.

DA SILVA, E. L. et al. Reproductive Behaviour of the Annona Fruit Borer, *Cerconota anonella*. **Ethology**, v. 112, p. 971–976, 2006.

Referências bibliográficas*Edjane Vieira Pires*

DE LIMA, E. R. **Feromônio sexual do bicho-mineiro do café, *Leucoptera coffeella*: avaliação para uso em programas de manejo integrado**. 2001. 81f. Tese (Doutorado em Ciências) Viçosa Minas Gerais. 2001.

DELISLE, J.; MCNEIL, J.N. Calling behaviour and pheromone titre of the true armyworm ***Pseudaletia unipuncta*** (Haw.)(Lepidoptera: Noctuidae) under different temperature and photoperiodic conditions. **Journal of Insect Physiology**, v. 33, p. 315-324, 1987.

DE MELO, B. S. C. **Avaliação do potencial inseticida de produtos naturais e sintéticos no controle das brocas da graviola**. 2006. 61f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/fitotecnia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2006.

DuRANT J. A. , et al. Effectiveness of four blends of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) sex pheromone isomers at three locations in South Carolina. **Journal of Agricultural Entomology** v. 12, p. 241–253, 1995.

ECOLOGIA-RELAÇÕES ECOLÓGICAS: Herbivoria (tipo de predação) (2010). Disponível em: www.faqbio.blogspot.com. Acesso em 30 dezembro 2012.

EIRAS, A.E e MAFRA NETO, A. Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento de insetos.in:VILELA, E.F; DELLA LUCIA, T.M.C. **Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas**. 2ed. Riberão Preto : Holos p.27-39, 2001.

EL-SAYED, A.M., et al. Potential of mass trapping for long term pest management and eradication of invasive species. **Journal of Economic Entomology**. v.99, p.1550–1564, 2006.

EL-SAYED, A.M. (2009) The Pherobase: data base of insect pheromones and semiochemicals. <http://www.pherobase.com>.

Referências bibliográficas*Edjane Vieira Pires*

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL. Proposta para um manejo integrado de pragas e doenças da anonicultura. Maceió: **EMATER/AL**, 41p, 1989.

FERREIRA, J.T.B.; et al. **Produtos Naturais no Controle de Insetos**. Editora UFScar. Cap. 4, p. 75-103. 2001.

FILHO, G.C de A., et al. Instruções técnicas para o cultivo da gravioleira. **Embrapa** Fortaleza-CE, (Instruções Técnicas , 02). p.1-9. 1998.

FONSECA, M.G., et al. Polyandrous behavior in *Cerconota anonella* Sepp (Lepidoptera: Oecophoridae). **Neotropical Entomology**, v. 35, p. 277-278, 2006.

FRANCKE., W., et al. New type of Sesiidae sex pheromone identified from hornet moth *Sesia apiformis*. **Jounal Chemical Ecology**. v. 30, p. 805–817, 2004.

FRANCO, M. R. B. Aroma e sabor de alimentos: temas atuais. São Paulo: **Varela**. p.33. 2003.

FREITAS, M. R. T., et al. The predominance of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane fields in the State of Alagoas. **The Florida Entomologist**. **2007**, 90, 309-313.

GALLO, D.; et al. Entomologia Agrícola. Piracicaba: FEALQ – **Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz**, p.33. 2002.

GILLESPIE, et al. Determination of the sex-pheromone components of *cheimophila salicella* (Lepidoptera: Oecophoridae), a pest of blueberry in british Columbia. **The Canadian Entomologista**. v.116 p. 1397-1402. 1984.

Referências bibliográficas*Edjane Vieira Pires*

GRIES R., et al. Sex pheromone components of *Diatraea considerate* (Heinrich) (Lep.: Pyralidae). **Journal of Applied Entomology**. v. 122, p. 265–268, 1998.

GRIES R., et al. Agonists and antagonists of antennal responses of gypsy moth (*Lymantria dispar*) to pheromone disparlure and other odorants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, p. 3708-3719, 2010.

GROB, K. Injection Techniques in capillary GC. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 1009-1019, 1994.

GULLAN, P.J; CRANSTON, P.S. Os insetos:Um resumo de entomologia. 3 ed São Paulo: **Roca**, p.440, 2007.

HARDIE, J.e MINKS, A. L. Pheromones of non-lepidopteran insects associated with agricultural plants. CABI Publishing, **Waltingford**. 1999.

HEDIN PA., et al. Identification of the sex attractant pheromone of the southwestern corn borer *Diatraea grandiosella* (Dyar). **Journal Chemical Ecology**, v. 12, p. 2051–2063, 1986.

HICKEL, E.R., VILELA, E.F. Comportamento de chamamento e aspectos do comportamento de acasalamento de *Scrobipalpus absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), sob condições de campo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 20, n. 1, p. 174-182, 1991.

HOWSE, P.E., STEVENS, I.D.R., JONES, O.T. Insect Pheromones and Their Use in Pest Management. **Chapman e Hall**, London, p 255, 1998

IBARRA, R. T. L. B. **Monitoramento de *Leucoptera coffeella* com armadilha de feromônio sexual**. 2006, 89f. Tese (Doutorado em entomologia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG. 2006.

Referências bibliográficas*Edjane Vieira Pires*

IBRAF. Instituto Brasileiro de Frutas. Disponível em:

<http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp>. Acesso em: 10 /01/2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1736&id_pagina=1>. Acesso em: 10/01/2013.

ISLAM, M. D. A. et al. Synthesis and Characterization of 2,13- and 3,13-Octadecadienals for the Identification of the Sex Pheromone Secreted by a Clearwing Moth. **Jounal Chemical Ecology**, v. 33, p. 1763-1773, 2007.

JACOBSEN, M., R. E. .,et al. Sex pheromones of the *Southern armyworm* moth:isolation, identification and synthesis. **Science**, v. 170 p. 542-544, 1970.

JANZANTTI N.S. **Compostos de voláteis e qualidade de sabor da cachaça**. 2004. 80f. Tese de Doutorado (doutorado em ciências de alimentos). Universidade Estadual de Campinas . Campinas-SP. 2004.

JOLY, A. B. Botânica: introdução a taxonomia vegetal. 12ª ed., São Paulo: **Companhia Editora Nacional**. p. 24 1998.

JUNQUEIRA, N. T. V. et al. Graviola para exportação: aspectos fitossanitários. Brasília: **EMBRAPA**, (Série Publicações Técnicas, FRUPEX, 22). p. 67. 1996.

JURENKA, R.A. et al. Sex Pheromone Component Ratio in the Cabbage Looper Moth Altered by a Mutation Affecting the Fatty Acid Chain- Shortening Reactions in the Pheromone Biosynthetic Pathway. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 24, p. 373-381, 1994.

KATAOKA, H. et al. Applications of solid phase microextraction in food analysis. **Journal of Chromatography**, v. 880, p. 35–62, 2000.

KLOWDEN, M.J. Physiological systems in insects. 2ed. Burlington; San Diego, London: **PressAcademy**, p.699, 2007.

KOLENBRANDER, P.E, et al. Communication among oral bacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, vol. 66, p. 486–505, 2002.

KONDO, Y., et al. Pheromones and body coloration affect mate recognition in the Japanese nine-spotted moth *Amata fortune* (Lepidoptera: Arctiidae). **Journal of Ethology**, v. 30 p. 301-308, 2012.

KONDO A .; TANAKA F. Action range to the sex pheromone of the rice stem borer moth *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 29, p. 55-62, 1994.

LANÇAS, F. M., Extração em Fase sólida (SPE) – São Carlos, **RiMa**. p. 93. 2004.

LEE, S., et al. Sex Pheromone Composition of the Diamondback Moth, *Plutella xylostella*(L.) in Korea **Journal of Asia-Pacific Entomology**., v. 8, p. 243- 248, 2005.

LEITE e LOPES, A. Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 160-168, 2003.

LOPES, J.G.V.;et al. A gravioleira. Fortaleza, **BNB**, 1994.

LORENZI, H.; MATOS, F. de A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA**. p. 512. 2002.

Referências bibliográficas*Edjane Vieira Pires*

MANI, V. Properties of commercial MEFS coatings. In J. Pawliszyn (Ed.), Application of solid phase microextraction (pp. 57–72). Bodmin, Cornwall, UK: **Royal Society of Chemistry**, 1999.

MARSILI, R.; Techniques for analyzing food aroma. New York, **Marcel Dekker Inc.** p.1-26. 1997.

MAAS, P.J.M. et al. Annonaceae from central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v. 52, p. 61-94, 2001.

McCOMIE, L.D. The soursop (*Annona muricata* L.) in Trinidad: its importance, pests and problems associated with pest control. **Journal of the Agricultural Society of Trinidad and Tobago**, v. 87, p. 42-55, 1987.

MCLAFFERTY, F. W. Interpretation of Mass Spectra. **Mill Valley**, Califórnia: N. Turno. p.66. 1994.

MELO, G. S. et al. Cultivo da gravioleira (*Annona muricata* L.). **IPA**, Recife-PE, (Instruções Técnicas, 13). p.3 1983.

MELO, G. S. Manejo integrado de pragas e doenças de anonáceas. **IPA**, Recife-PE, (Comunicado técnico, 37). p.13.1991.

MENDONÇA, A. L. **Comportamento reprodutivo, extração e identificação do feromônio sexual da broca pequena da cana-de-açúcar *Diatraea flavipennella*, Box, 1931(Lepidoptera: Crambidae)**. 92f. Tese (Doutorado em química e Biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas. Maceió AL. 2009.

MICHEREEF, M. F. F. et al. Mating Behavior of the Coffee Leaf-Miner *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 376-382, 2007.

Referências bibliográficas*Edjane Vieira Pires*

MILLAR, J. G. et al. (9Z)-9,13-Tetradecadien-11-ynal, the sex pheromone of the avocado seed moth, *Stenoma catenifer*. **Tetrahedron Letters**. v. 49, p. 4820–4823, 2008.

MORAIS, O. M et al. Armazenamento de sementes de *Annona squamosa*L. **Biotemas**. v.22, p. 33-44, 2009.

MOURA, J. I. L. et al. Uso de fêmeas virgens na coleta massal de *Bephratelloide spomorum* (Fab.) (Hymenoptera:Eurytomidae) em *Annona muricata* L. (Annonaceae). **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**. v.77, 2006.

MOZIRAITIS, R., et al. New sex attractants and inhibitors for 17 moth species from the families Gracillariidae, Tortricida e, Yponomeutidae, Oecophoridae, Pyralidae and Gelechiidae. **Journal of Applied Entomology**. v. 122, p. 441-452, 1998.

NAKA., H. et al. Synthesis and characterization of 3,13- and 2,13-octadecadienyl compounds for identification of the sex pheromone secreted by a clearwing moth, *Nokona pernix*. Bioscience, **Biotechnology, and Biochemistry**., v. 70, p. 508-516, 2006.

NAKA H., et al. Sex pheromone of the persimmon fruit moth, *Stathmopoda masinissa*: identification and laboratory bioassay of (4E,6Z)-4,6-hexadecadien-1-ol derivatives. **Jounal Chemical Ecology**, v. 29, p. 2447–2459, 2003.

NAKANO R., et al. Moths are not silent, but whisper ultrasonic courtship songs. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, p. 4072–4078, 2009.

NAVICKIENE., et al. Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e Cinéticos. **Scientia plena**. no. 7, v. 4, p.44. 2008.

Referências bibliográficas*Edjane Vieira Pires*

NOGUEIRA, P. C. L. **Contribuição à química dos compostos voláteis e interações com os organismos receptores**. 2002, 211f. **Tese** (Doutorado em química) Universidade de Campinas, Campinas-SP. 2002.

OLIVEIRA, M. A. S. Graviola produção: aspectos técnicos. Brasília: **Embrapa-Cerrados**, (Frutos do Brasil, 15). p.78. 2001.

OSTRAUSKAS, H. et al. Moths caught in traps during a survey of *Choristoneura fumiferana* (Clemens, 1865) - Lepidoptera, Tortricidae - in Lithuania. **Acta Zoologica**. V. 20 p.156-161. 2010.

PARRA-PEDRAZZOLI, A.L. **Isolamento, identificação, síntese e avaliação de campo do feromônio sexual do minador-dos-citros, *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera:Gracillariidae)**. 82f. Tese (Doutorado em ciências) Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Campinas-SP. 2006.

PAVIA, D.L .; LAMPAMAN, G.M.; KRIZ, G.S. Introduction to Spectroscopy. 2a ed. **Copyright**. p. 325.1996.

PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction. Theory and practice. New York: **Wiley-VCH**. p.105. 1997.

PAWLISZYN, J. Application of solid phase microextraction. Ontario, Canada: **Royal Society of Chemistry**. 1 ed. p. 111, 1999.

PELLMYR, O. e J. LEEBENS-MACK. Forty million years of mutualism: evidence for Eocene origin of the yucca-yucca moth association. Proceedings of the National **Academy of Sciences**, v. 96 p. 9178-9183.1999.

Referências bibliográficas*Edjane Vieira Pires*

PEÑA, J. et al. Pollinators and pests of *Annona* spp. In: PEÑA, et al. **Tropical fruit pests and pollinators of tropical fruit crops: biology, economic importance, natural enemies and control**. New York : cab international, p. 197-222, 2002.

PEREIRA, M.C.T., et al. Efeito do ensacamento na qualidade dos frutos e na incidência da broca-dos- frutos da Ateemoieira e da Pinheira. **Bragantia**, v. 68, p. 389-396, 2009.

PEREIRA e BERTI-FILHO. Thermal requirements and estimate of the *Annona* fruit borer (*Cerconota anonella*) generations number. **Ciência Rural**, vol. 39, p 2278-2284, 2009.

PINTO e SILVA. Graviola para exportação: aspectos técnicos da produção. **Embrapa – SPI**. (Série Publicações Técnicas FRUPEX, 7). p.41. 1994.

PIRES, C.C.S.S., VILELA, E.F., VIANNA, P.A. Comportamento de fêmeas de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) associado à liberação de feromônio sexual. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 1-12, 1994.

ROELOFS, W.L. e R.T. CARDÉ. Responses of Lepidoptera to synthetic sex pheromone chemicals and their analogues. **Annual Review of Entomology**, v.22, p.377-405, 1977.

SANDERS, C.J. Mechanisms of mating disruption in moths. In: Carde, R.T., Minks, A.K. (Eds.), *Insect Pheromone Research: New Directions*. **Chapman e Hall, London**, p. 333–346, 1997.

SIDES, A.; et al. Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19 , p. 322-329, 2000.

SCHAL, C, et al. Temporal patterns of sex pheromone titer and release rates in *Holomelina lamae* (Lepidoptera: Arctiidae). **Journal Chemical Ecology**, v. 13, p. 1115-1129, 1987.

Secretaria de Estado do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos, (disponível em: http://www.semarh.al.gov.br/tempo-e-clima/banco-de-dados/precipitacao-mensal/dados-de-precipitacao-mensal/Dados_mensais_2012.pdf. Acesso em: 30 de março 2013).

SEPLANDE. APL FRUTICULTURA DO AGRESTE – PINHA. (disponível em: <http://www.seplande.al.gov.br/desenvolvimento-economico/industria-comercio-e-servicos/oportunidade-de-negocios/arranjo-produtivo-locais/APL%20FRUTICULTURA.pdf> Acesso em: 14 março 2013).

SILVA, J.F **Produção e nutrição mineral de pinheira adubada com silicato de cálcio e magnésio**. 2011. 76f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba-MG. 2011.

SILVA, R.C.C. **Influência dos constituintes voláteis de pinha (*Annona squamosa* L.) E GRAVIOLA (*Annona muricata* L.), no comportamento da broca-do-fruto *Cerconota anonella***. Monografia (curso de Química). Universidade Federal de Alagoas-UFAL, Maceió-AL, 2012.

SILVA, S. S. **Fatores da biologia reprodutiva que influenciam o manejo comportamental de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)**. 2008. 63f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE. 2008.

SONENSHINE, D. E. Tick pheromones and their use in tick control. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 557-580, 2006.

STRANDH, M. Evolution of sex pheromone production in moths introductory paper no 171. Department of Ecology **Chemical Ecology**. Lund University. p.6. 2006.

Referências bibliográficas*Edjane Vieira Pires*

SUBCHEV M., et al. 1-Methylethyl octanoate, a new lepidopteran sex pheromone from the bagworm, *Megalophanes viciella*. **Journal of Chemical Ecology**. v. 26, p. 487-495, 2000.

SURLYKKE A., et al. Sonic hearing in a diurnal geometrid moth, *Archiaris parthenias*, temporally isolated from bats. **Naturwissenschaften** v. 85, p. 36–37, 1998.

TAMAKI, Y., et al. Electroantennogram activities of sex pheromone analogues and their synergistic effect on field attraction in the diamondback moth. **Applied Entomology and Zoology**. V.14, p.362-364, 1979.

TANG, J. D, et al. Regulation of pheromone biosynthesis by a brain hormone in two moth species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 1806-1810, 1989.

TÓTH, M et al.. Post season field screening of lepidopterous sex attractant candidates in Hungary. **Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae**. V.14 p.195-199. 1979.

TREMATERRA, P. Advances in the use of pheromones for stored-product protection. **Journal of Pest Science**, v. 85, p. 285–299, 2012.

THOMAZINI, M.; FRANCO, M.R.B. Metodologia para análise de constituintes voláteis do sabor. **Boletim SBCTA**, v. 34, 54-59, 2000.

UFV – Universidade Federal de Viçosa. 2007. SAEG– **Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Versão 9.1. UFRV, Viçosa, MG, 2007 150p.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Micro-extração em fase sólida. **Química nova**, v. 23, p. 523-530, 2000.

Referências bibliográficas*Edjane Vieira Pires*

VEGLIANTE, F. e I. HASENFUSS. Morphology and diversity of exocrine glands in lepidopteran lagartae. **Annual Review of Entomology** v. 57, p. 187–204, 2011.

WALL, C. A. R. et al. Eletroantenographic and field responses of the pea moth *Cydianigranato* sex attractants and related compounds. **Physiological Entomology**, v.1 p. 151- 157, 1989.

WAQUIL, J. M.; VIANA, P.A.; CRUZ, I. Cultivo do Milho. Sistema de produção. 2ª Edição. **Embrapa milho e sorgo**. 2006.

WARDENCKI., et al. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 703–717, 2004.

WITZGALL, P. P. et al. Pheromone communication channels in tortricid moths: lower specificity of alcohol vs. acetate geometric isomer blends. **Bulletin of Entomological Research**, v. 100, p. 225 230, 2010.

WYATT, T.D. Putting pheromones to work: paths forward for direct control. In: Carde', R.T., Minks, A.K. (Eds.), **Insect Pheromone Research: New Directions**. Chapman & Hall, London, p. 445–459, 1997

YAMAKAWA, R. et al. (6Z,9Z,12Z)-6,9,12-Octadecatriene and (3Z,6Z,9Z,12Z)-3,6,9,12-icosatetraene, the novel sex pheromones produced by emerald moths. **Tetrahedron Letters** v. 50, p. 4738–4740, 2009.

ZARBIN, P. H. G. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, No. 3, v. 32, , p.722-731, 2009.

Referências bibliográficas

Edjane Vieira Pires

ZHANG, J. P et al. An overlooked component: (Z)-9-tetradecenal as a sex pheromone in *Helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Physiology** v. 58, p. 1209–1216, 2012.