



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



THYAGO FERNANDO LISBOA RIBEIRO

SEMIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO CANA-DE-AÇÚCAR x BROCA  
GIGANTE E MANDIOCA x PERCEVEJO-DE-RENDA x MOSCA-BRANCA

MACEIÓ  
2015

THYAGO FERNANDO LISBOA RIBEIRO

SEMIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO CANA-DE-AÇÚCAR x BROCA  
GIGANTE E MANDIOCA x PERCEVEJO-DE-RENDA x MOSCA-BRANCA

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Química e Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia. Subárea: Produtos Naturais -Ecologia Química

Orientador: Dr. Alessandro Riffel

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade**

R484s Ribeiro, Thyago Fernando Lisboa.  
Semioquímicos envolvidos na interação cana-de-açúcar x broca gigante e  
mandioca x percevejo-de-renda x mosca-branca / Thyago Fernando Lisboa  
Ribeiro. – 2015.  
66f. : il. tabs., graf.

Orientador: Alessandro Riffel.

Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade  
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de  
Pós-Graduação em química e biotecnologia. Maceió, 2015.

Bibliografia: f. 63-66.

1. Trans- $\beta$ -ocimeno. 2. Compostos orgânicos voláteis. 3. Pragas –  
Controle. 4. Atividades antimicrobiana. 5. Semioquímicos. I. Título.

CDU: 543.97



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/Fax: (82) 3214-1144  
email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de Thyago Fernando Lisboa Ribeiro, intitulada: "Semioquímicos envolvidos na interação cana-de-açúcar x broca gigante e mandioca x percevejo de renda x mosca branca", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 15 de julho de 2015, às 08h, na Sala de Reuniões do IQB na Universidade Federal de Alagoas.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Alessandro Riffel  
Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Jaim Simões de Oliveira  
(UNIT/Maceió)

Prof. Dr. Eljo Cesar Guzzo  
(EMBRAPA)

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. João Gomes da Costa  
(EMBRAPA)

Ao meu Pai Antonio Ribeiro e à minha mãe Maria Lisboa, à minha esposa Lanne Machado e à minha pequenina Isabelly e aos meus irmãos Paullo, Marcyo e Karlos, por acreditarem no meu sonho, pela compreensão, carinho e por se fazerem presentes em todos os momentos de dificuldade e alegria.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por ter me guiado, me protegido e ter colocado pessoas iluminadas na minha vida. (Deus é a luz do meu Caminho).

Ao Professor Dr. Antonio Euzébio Goulart Santana e ao Dr. Alessandro Riffel pela orientação, paciência, incentivo, oportunidades e ensinamentos imprescindíveis para realização deste trabalho.

Aos Amigos Demétrios, Bira, Pamela, Aryanna, Mariana, Isis, Kelly e Henrique pelas boas horas de estudo e distração.

A todos os Amigos e colegas do laboratório de Pesquisa em Produtos e Recursos Naturais (LPqRN).

Aos técnicos Aldy e Margarida pela atenção, colaboração e amizade.

A todos os amigos e parentes que sempre acreditaram no meu potencial e ajudaram direta ou indiretamente para a realização desse objetivo.

## RESUMO

O Brasil é conhecido mundialmente por sua vocação natural para a agricultura. Dentre as principais culturas agrícolas destacam-se a cana-de-açúcar e a mandioca, culturas com forte influência socioeconômica, sendo a mandioca importante para a pequena agricultura ou agricultura familiar e, a cana-de-açúcar, historicamente mais relevante para agroindústria e o agronegócio. Apesar da alta produção agrícola nessas duas culturas, ambas sofrem bastante com a incidência de pragas o que acaba acarretando em perdas consideráveis. O controle de insetos-praga tem sido normalmente realizado por meio de inseticidas, o que é indesejável tanto por motivos econômicos e ambientais, pois além de eliminarem os inimigos naturais, aumentam a possibilidade do desenvolvimento de populações de pragas resistentes aos inseticidas. Os semioquímicos aparecem como a possibilidade mais viável e ecologicamente correta para atuar no controle dessas pragas. Dessa forma, este trabalho teve os seguintes objetivos 1) identificar os compostos orgânicos voláteis (COVs) de uma cultivar resistente de mandioca (*Manihot esculenta*), e avaliar a repelência de seus COVs frente à mosca-branca que ataca a mandioca. Além disso, tentou-se identificar os compostos epicuticulares (CEs) de lagartas e adultos da broca gigante (*Telchin licus*) e avaliar a atividade antimicrobiana desses compostos frente a microrganismos endofíticos isolados de cana-de-açúcar. Os COVs foram identificados utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A cultivar resistente emite, em plantas não infestadas, vários compostos que podem estar envolvidos na defesa da planta, além de apresentar uma alta emissão do monoterpeneo trans- $\beta$ -ocimeno, que mostrou repelência frente à mosca-branca. Os compostos epicuticulares das lagartas e adultos da broca gigante foram identificados utilizando cromatografia acoplada à espectrometria de massas. Os CEs das lagartas apresentaram em sua composição, principalmente ésteres de cadeia longa, chegando a um percentual de 98% em sua composição total. Esses compostos mostraram atividade antimicrobiana frente aos isolados endofíticos "G" (não-identificado) e o isolado "O" (*Bacillus cereus*). Os CEs dos adultos machos e fêmeas da broca gigante apresentaram perfis semelhantes em sua maioria n-alcanos (C-23 a C-30), no entanto os CEs dos machos apresentaram três compostos exclusivos que podem estar relacionados à comunicação entre os sexos.

**Palavras-chave:** COVs. trans- $\beta$ -ocimeno. Resistência. atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

Brazil is known worldwide for its natural vocation for agriculture. Among the main crops is the sugarcane and cassava that are cultures with strong socioeconomic influence cassava being the main crop in small-scale farming and family agriculture, and sugarcane historically more relevant to agro-industry and agribusiness. Despite the high agricultural production in these two cultures, both suffer greatly with the incidence of pests which results in considerable production losses. Pest control is usually performed by insecticides, which is undesirable both for economic and environmental reasons, it eliminates natural enemies, and increase the possibility of insecticide resistance. The use of semiochemicals provide a more viable and environmental friendly approach to control these pests. Thus, this study aimed to identify volatile organic compounds (VOCs) from a resistant cassava cultivar (*Manihot esculenta*), and to evaluate the repellency of its VOCs to white flies that attack cassava. In addition we aimed to identify the epicuticular compounds (EC) of the larvae and adult giant sugarcane borer (*Telchin licus*) and to evaluate the antimicrobial activity of these compounds against endophytic microorganism isolated from sugarcane. VOCs were identified using gas chromatography coupled mass spectrometry. The resistant cultivar in uninfested plants emitted several compounds that may be involved in plant defense, while maintaining a high emission of trans- $\beta$ -ocimene monoterpene, which showed repellency against the whitefly. The epicuticular compounds of larvae and adults of giant sugarcane borer were identified using chromatography coupled mass spectrometry. The ECs from the larvae showed in particularly, long-chain esters, reaching a 98% of its total composition. These compounds showed antimicrobial activity against the isolated endophytic "G" (unidentified) and isolated "O" (*Bacillus cereus*). ECs of the adult male and female giant sugarcane borer showed similar profiles, mostly n-alkanes (C-23 to C-30), however the ECs from males have three unique compounds that may be related to communication between genders.

**Keywords:** VOCs. trans- $\beta$ -ocimene. Resistance. antimicrobial activity.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Ciclo biológico do percevejo-de-renda.....	15
<b>Figura 2</b>	Planta infestada com percevejo-de-renda e seus estágios.....	15
<b>Figura 3</b>	Morfologia das folhas de mandioca atacada pelo percevejo-de-renda.....	16
<b>Figura 4</b>	Plantas de mandioca infestadas com mosca branca.....	18
<b>Figura 5</b>	Ciclo biológico da Broca gigante <i>Telchin licus</i> .....	21
<b>Figura 6</b>	Principais rotas Biosintéticas de COVs produzidos por plantas...	28
<b>Figura 7</b>	Rotas Biosintética dos terpenóides em plantas.....	29
<b>Figura 8</b>	Principais terpenóides liberados por plantas.....	31
<b>Figura 9</b>	Biossíntese de 2-metil-alcanos utilizando os esqueletos carbônicos de leucina e valina.....	33
<b>Figura 10</b>	Via Biosintética de hidrocarbonetos metil-ramificado.....	34
<b>Figura 11</b>	Copos plásticos com as plantas das duas cultivares de mandioca (Equador 72 e BRS jari).....	36
<b>Figura 12</b>	Coleta dos COVs de plantas das duas cultivares de mandioca (Equador 72 e BRS jari).....	36
<b>Figura 13</b>	Olfatômetro utilizado nos Bioensaios de repelência.....	39
<b>Figura 14</b>	Extração de compostos epicuticulares de broca gigante.....	41
<b>Figura 15</b>	Cromatograma dos compostos cuticulares das lagartas da Broca gigante extraídos com hexano.....	44
<b>Figura 16</b>	Cromatograma dos compostos cuticulares das lagartas da broca gigante extraídos com hexano.....	49
<b>Figura 17</b>	Compostos presentes nas epicutículas de machos e fêmeas da broca gigante.....	50
<b>Figura 18</b>	Ensaio de atividade antimicrobiana com os isolados endofíticos da cana-de-açúcar.....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	As classes encontradas e seus compostos presentes nos dois cultivares nos dois tratamentos.....	45
<b>Tabela 2</b>	Compostos encontrados nas epicutículas das lagartas da broca gigante da cana-de-açúcar.....	49
<b>Tabela 3</b>	Compostos presentes na cutícula de machos e fêmeas da broca gigante.....	51
<b>Tabela 4</b>	Atividades dos extratos epicuticulares das lagartas Broca gigante frente alguns endofíticos isolados de cana de açúcar.....	52

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Produção de cana-de-açúcar por região.....	20
<b>Gráfico 2</b>	Curva de quantificação do padrão $\beta$ -ocimeno.....	46
<b>Gráfico 3</b>	Emissão de trans-beta-ocimeno por plantas controle e infestada dos dois cultivares.....	47
<b>Gráfico 4</b>	Bioensaio de repelência à mosca-branca frente aos extratos de voláteis das cultivares BRS Jari, Equador 72 e Padrão de $\beta$ -Ocimeno.....	48
<b>Gráfico 5</b>	Intensidade dos compostos presentes nas epicutículas de machos e fêmeas da broca gigante.....	51

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Mandioca.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Principais insetos-praga da mandioca.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3</b>	<b>Percevejo-de-renda <i>Vatiga illudens</i> (Drake, 1922).....</b>	<b>15</b>
<b>2.4</b>	<b>Moscas-brancas - <i>Aleurothrixus aepim</i> (Goeldi, 1886), <i>Bemisia</i> spp. e <i>Trialeurodes</i> spp. (Hemiptera: Aleyrodidae).....</b>	<b>17</b>
<b>2.5</b>	<b>Cana-de-açúcar.....</b>	<b>19</b>
<b>2.6</b>	<b>Principais insetos praga da cana-de-açúcar.....</b>	<b>20</b>
<b>2.7</b>	<b>Broca gigante <i>Telchin licus</i> (Drury, 1773).....</b>	<b>21</b>
<b>2.8</b>	<b>Resistência de plantas.....</b>	<b>22</b>
<b>2.9</b>	<b>Semioquímicos.....</b>	<b>23</b>
<b>2.10</b>	<b>Manejo integrado de pragas (MIP).....</b>	<b>24</b>
<b>2.11</b>	<b>Compostos Orgânicos Voláteis de plantas (COVs).....</b>	<b>25</b>
<b>2.12</b>	<b>Localização da biossíntese de COVs em plantas.....</b>	<b>27</b>
<b>2.13</b>	<b>Principais Rotas Biosintéticas de COVs.....</b>	<b>28</b>
<b>2.14</b>	<b>Biossíntese de Terpenóides.....</b>	<b>29</b>
<b>2.15</b>	<b>Compostos epicuticulares de insetos.....</b>	<b>31</b>
<b>2.16</b>	<b>Sítio de biossíntese dos hidrocarbonetos epicuticulares.....</b>	<b>32</b>
<b>2.17</b>	<b>Vias biosintéticas dos hidrocarbonetos.....</b>	<b>32</b>
<b>2.18</b>	<b>Biossíntese de hidrocarbonetos Metil-Ramificados.....</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Perfil dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de diferentes cultivares de Mandioca.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Obtenção e manutenção das plantas e dos insetos.....</b>	<b>35</b>

3.1.2	Coleta dos compostos orgânicos voláteis das plantas.....	36
3.1.3	Análises dos COVs.....	37
3.1.4	Quantificação do padrão.....	38
3.1.5	Bioensaios de repelência da mosca-branca frente aos COVs de mandioca.....	38
3.1.6	Análise estatística.....	39
<b>3.2</b>	<b>Compostos epicuticulares da broca gigante (<i>T. licus</i>).....</b>	<b>40</b>
3.2.1	Obtenção dos Insetos.....	40
3.2.2	Extração dos epicuticulares de lagartas e adultos da Broca gigante.....	40
3.2.3	Análise dos compostos epicuticulares das lagartas e adultos da broca gigante.....	41
3.2.4	Atividade antimicrobiana dos compostos epicuticulares.....	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>COVs de <i>Manihot esculenta</i>.....</b>	<b>44</b>
4.1.1	Identificação do perfil dos COVs das cultivares de mandioca.....	44
4.1.2	Bioensaio de repelência usando os COVs dos dois cultivares.....	47
<b>4.2</b>	<b>Identificação dos compostos epicuticulares das lagartas da broca gigante.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3</b>	<b>Identificação dos compostos epicuticulares dos adultos da broca gigante.....</b>	<b>50</b>
<b>4.4</b>	<b>Atividade antimicrobiana dos compostos epicuticulares.....</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>5.1</b>	<b>COVs emitidos pelas duas cultivares de mandioca.....</b>	<b>53</b>
<b>5.2</b>	<b>Bioensaios de repelência dos COVs das duas variedades frente a mosca-branca.....</b>	<b>55</b>
<b>5.3</b>	<b>Compostos epicuticulares das lagartas da broca gigante.....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é conhecido mundialmente por sua vocação natural para a agricultura. A vasta extensão territorial combinada com a oferta abundante do sol e água são recursos fundamentais para a atividade agropecuária, são essas as qualidades que o colocam à frente de outros países produtores. O Brasil é o quinto maior produtor agrícola do mundo. Dentre as principais culturas, a cana-de-açúcar e mandioca são culturas com forte influência socioeconômica, sendo a mandioca muito importante para a pequena agricultura ou agricultura familiar, e a cana-de-açúcar, historicamente mais relevante para agroindústria e o agronegócio. Na produção de mandioca, o Brasil ocupa a 2ª colocação no ranking mundial com 26 milhões de toneladas anuais. Já na produção de cana-de-açúcar, o país é o maior produtor do mundo, tendo sua produção na safra 2014/2015 estimado em torno de 642,1 milhões de toneladas. Apesar da alta produção agrícola nessas duas culturas, ambas sofrem com a incidência de pragas, o que acaba acarretando em perdas consideráveis na produção. Atualmente os métodos de controle de insetos pragas são na sua maioria realizados através do uso dos inseticidas que em alguns casos são eficientes, entretanto, podem causar danos ambientais se acumulando no ambiente e trazem diversos problemas a saúde humana bem como ao meio ambiente. Com todos esses problemas causados pelo uso de inseticidas, vem se buscando alternativas para o controle desses insetos-praga. Os semioquímicos aparecem como a possibilidade viável e ecologicamente correta para atuar no controle a essas pragas. Dentre os semioquímicos podemos destacar os COVs que desempenham uma série de atividades envolvidas na defesa de plantas e os compostos epicuticulares que além de proteção, parecem estar envolvidos na comunicação de curta distância entre os insetos. Portanto, este trabalho visa, através do estudo de semioquímicos, promover o avanço do conhecimento para estas duas culturas para uma possível aplicação no manejo de pragas de cana-de-açúcar e da mandioca. O trabalho procurou identificar os compostos epicuticulares da Broca gigante da cana-de-açúcar e identificar suas atividades biológicas que podem atuar como feromônios de contato e na proteção do inseto e identificar os COVs responsáveis ou que colaboram com a resistência da mandioca a pragas podendo servir também como uma ferramenta para o melhoramento genético no desenvolvimento de cultivares mais resistentes.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

O Brasil é conhecido mundialmente por sua vocação natural para a agricultura. A vasta extensão territorial combinada com a oferta abundante do sol e água são recursos fundamentais para a atividade agropecuária. Essas são as qualidades que o colocam à frente de outros países produtores. O Brasil é o quinto maior produtor agrícola do mundo, com uma produção que gera cerca de US\$ 100 bilhões em divisas. Se considerada a parcela destinada à exportação, a agricultura brasileira sobe para o terceiro lugar da lista (<http://www.ipea.gov.br>, 2011).

A produção agrícola nacional experimentou expansão relevante nos últimos quinze anos, contribuindo para que o Produto Interno Bruto (PIB) do país registrasse crescimento médio anual de 3,1% no período (Boletim regional B.C., 2012). Entre as culturas responsáveis pela alta produtividade agrícola brasileira estão: soja, milho, cana-de-açúcar, café, arroz, laranja, mandioca, entre outras.

O Brasil é dividido em cinco macrorregiões: Centro-oeste, Norte, Sudeste, Sul e Nordeste. A região nordeste tem entre as suas principais culturas agrícolas a cana-de-açúcar, soja, milho, mandioca e banana.

### 2.1 Mandioca

Originária do continente americano, provavelmente do Brasil Central, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) já era amplamente cultivada pelos povos indígenas, antes da descoberta do Brasil. Eles foram os responsáveis pela sua disseminação em quase toda a América e os portugueses pela sua difusão para outros continentes, especialmente África e Ásia (SOUZA & OTSUBO, 2002 apud LORENZI & DIAS, 1993).

Essa cultura é sensível a baixas temperaturas, sendo cultivada principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Hoje é cultivada por milhões de pequeno-agricultores em mais de 100 países, onde apresenta uma variedade de nomes locais: mandioca no Brasil, yuca em Honduras, ketela pohon na Indonésia, mihogo no Quênia, akpu na Nigéria e san no Vietnã (FAO, 2013).

O cultivo da mandioca é bastante difundido no Brasil, pois a cultura se adapta bem às diversas condições de clima e solo do país. Nas áreas rurais, principalmente das regiões norte e nordeste, constitui a base da alimentação de muitas populações, o que lhe confere um caráter vinculado à segurança alimentar. As raízes são ricas em carboidratos e muito apreciadas, podendo ser consumidas após simples cozimento e/ou após transformação em diversos tipos de farinhas. Além disso, as folhas podem ser aproveitadas na alimentação humana (suplemento) e animal (triturada). As hastes, na alimentação animal, sob a forma de silagens, fenos e ainda “*in natura*” (IBGE, 2010; CONAB, 2014).

O Brasil continua entre os principais países produtores de mandioca e ocupa a 2ª colocação no ranking mundial, com 26 milhões de toneladas anuais. De certa forma a produção brasileira de mandioca não apresenta variações nas últimas safras, o volume alcançado se estabilizou em torno de 25 e 26 milhões de toneladas (SEAB, 2014).

Diferente de outras culturas, como café, algodão e trigo, que são restritas a determinadas regiões, o cultivo da mandioca está presente em todos os estados brasileiros. Sua adaptabilidade às mais diversas condições climáticas garante à cultura da mandioca o sucesso de sua exploração (SEAB, 2014).

Na safra de 2012, a região nordeste registrou uma área colhida de 576.977 hectares e produziu 4,8 milhões de toneladas, sendo a segunda maior produção entre as regiões do Brasil. Entre os estados mais produtores da região nordeste e do país aparece o estado da Bahia (IBGE, 2010).

## **2.2 Principais insetos-praga da mandioca**

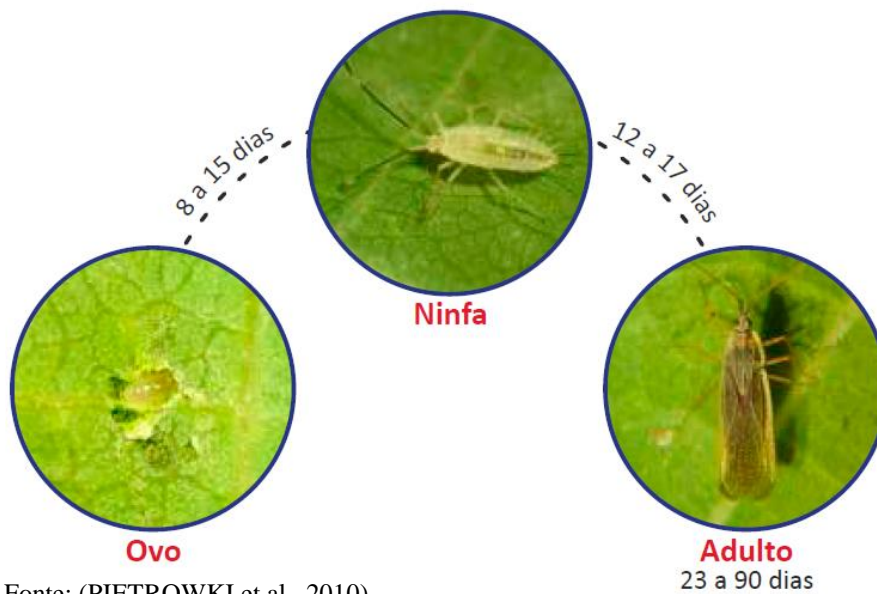
A mandioca, por se tratar de uma cultura de ciclo longo, está sujeita a diversos ataques de insetos e ácaros, alguns classificados como pragas de maior importância, podendo causar danos severos à cultura e resultar em perdas no rendimento. Já foram identificadas cerca de 200 espécies de insetos e ácaros que atacam a cultura. É importante conhecer tanto as pragas principais como as de menor importância, o que varia de região para região, de modo que se possa estabelecer uma estratégia de controle adequada. Dentre os principais insetos-praga estão: percevejo-de-renda, *Vatiga illudens* (Drake, 1922), mandarová (*Erinnyis ello ello* L.), ácaros (*Mononychellus tanajoa* e *Tetranychus urticae*), , diversas espécies de mosca-branca e a cochonilha (OTSUBO et al., 2002; PIETROWKI et al., 2010).



### 2.3 Percevejo-de-renda *Vatiga illudens* (Drake, 1922).

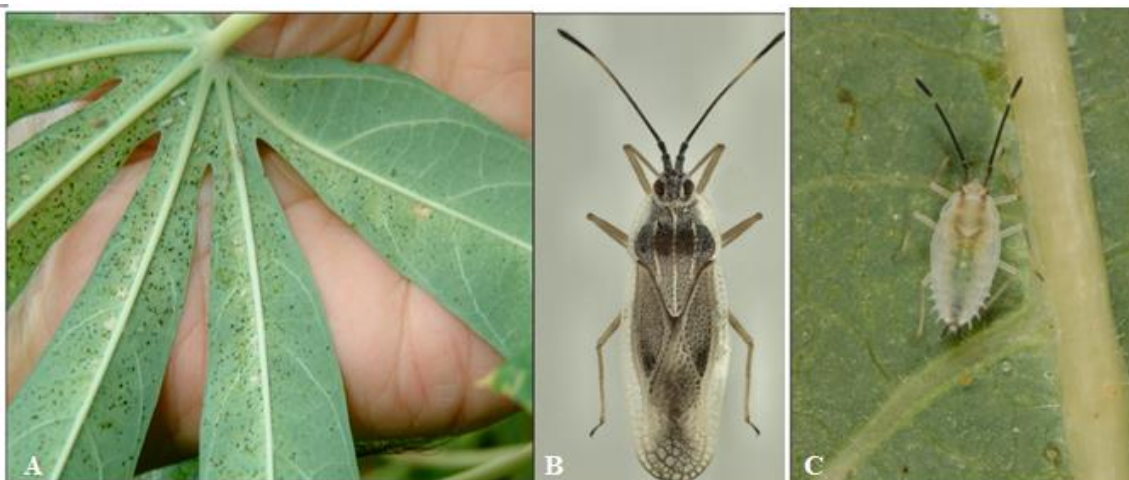
Os adultos são pequenos percevejos que apresentam cor cinza e cerca de 3 mm de comprimento. As fases jovens, chamadas de ninfas, são de coloração branca e menores que os adultos. Passam por cinco estádios ninfaís, que se completam em torno de 11 a 13 dias. Vivem em colônias encontradas na face inferior das folhas basais e medianas da planta, podendo colonizar as folhas apicais quando o ataque é severo. São insetos sugadores, que ocorrem no início da estação seca (PIETROWKI et al., 2010).

**Figura 1** Ciclo biológico do percevejo-de-renda.



Fonte: (PIETROWKI et al., 2010)

**Figura 2** Planta infestada com percevejo-de-renda e seus estágios.



A- Folhas de mandioca sofrendo ataque do percevejo e suas ninfas. B- Insetos adultos do percevejo-de-renda. C- Ninfas do percevejo. Fonte: (PIETROWKI et al., 2010)

Os danos à planta são causados tanto pelas ninfas como pelos adultos. Os sinais de ataque manifestam-se inicialmente por pequenas pontuações branco-amareladas, que aumentam em número e tamanho, tornando as folhas com manchas bronzeadas (Figura 3). Na face inferior das folhas aparecem inúmeros pontos pequenos, de cor preta, que correspondem aos excrementos dos insetos (PIETROWKI et al., 2010).

**Figura 3** Morfologia das folhas de mandioca atacada pelo percevejo-de-renda.



Fonte: (PIETROWKI et al., 2010)

Um dano considerável pode ocorrer quando as taxas de infestação da praga estão altas, o que torna as folhas cloróticas, reduzindo a taxa fotossintética e provocando sua queda. Dependendo da cultivar utilizada, da idade da cultura, da intensidade e da duração do ataque, essa praga causa queda acentuada na produtividade, principalmente em condições de baixa umidade. Alguns estudos apontaram reduções de 21% e 50%, respectivamente, na produção de raízes e massa verde do terço superior, em diferentes cultivares avaliadas nas condições de Cerrado (PIETROWKI et al., 2010).

#### Formas de controle

As medidas para reduzir a infestação da praga, se dão por meio da destruição dos restos culturais, plantios consorciados e rotação de culturas. Atenção deve ser dada no período da seca, que favorece a ocorrência da praga. A escolha da cultivar é importante, já que algumas são

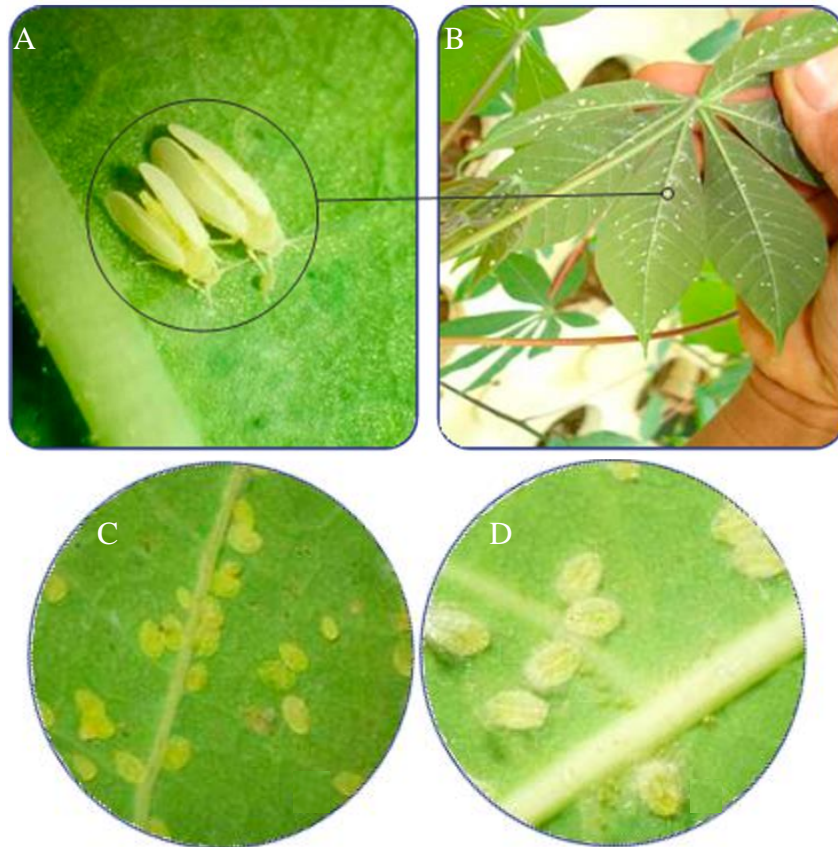
menos atacadas. O melhor controle consiste na utilização de cultivares mais tolerantes ao ataque e de manivas-sementes para o plantio oriundas de áreas isentas da infestação da praga. No Cerrado brasileiro, o uso dos inseticidas tiametoxan mais cipermetrina e dimetoato testados em 17 genótipos de mandioca, resultou em 100% de eficiência no controle de ninfas e adultos do percevejo. Embora eficientes, esses inseticidas não estão registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso na cultura da mandioca. O controle biológico com fungos entomopatogênicos da espécie *Beauveria bassiana* e da ordem Entomophthorales foi observado ocorrendo naturalmente em campo. Também em ensaios de laboratório *B. bassiana* tem se mostrado promissor, com mortalidade de até 100% (FIALHO & VIERA, 2011; PIETROWKI et al., 2010).

#### **2.4 Moscas-brancas - *Aleurothrixus aepim* (Goeldi, 1886), *Bemisia* spp. e *Trialeurodes* spp. (Hemiptera: Aleyrodidae).**

As moscas-brancas são insetos pequenos (cerca de 1mm a 2mm de comprimento). Os adultos apresentam asas membranosas cobertas com uma pulverulência branca são bastante ágeis e localizam-se principalmente na parte superior das plantas de mandioca. A fêmea ovípara na face inferior das folhas apicais e a fase jovem destas localiza-se até o terço mediano. Em geral, a fase jovem de ambas as espécies tem aspecto de escama de coloração amarelo-clara, contudo, diferenciam-se facilmente, pois a espécie *Aleurothrixus aepim* apresenta o corpo recoberto por alguns filamentos cotonosos, semelhante ao algodão, enquanto que *Bemisia tuberculata* apresenta o corpo sem filamentos (FIALHO & VIEIRA, 2011; PIETROWKI et al., 2010).

A fase jovem deste inseto passa por quatro instares onde, nos três primeiros alimenta-se sugando a seiva. Para *B. tuberculata*, a fase de ovo tem duração em média de 8,8 dias e a fase jovem de 23,3 dias, enquanto que *A. aepim* apresenta a duração de 6,5 e 16,9 dias para ovo e fase jovem, respectivamente (PIETROWKI et al., 2010).

**Figura 4** Plantas de mandioca infestadas com mosca branca.



A- Mosca-branca; B- Plantas de mandioca infestadas com mosca-branca; C- Ninfas de mosca-branca *B. tuberculata* D- Ninfas de mosca-branca da *A. aepim*. Fonte: (PIETROWKI et al.,2010).

Altas populações de mosca-branca geralmente ocorrem em períodos chuvosos, embora geralmente esteja presente durante todo o ciclo da cultura. As moscas-brancas causam danos diretos e indiretos à mandioca. O dano direto é causado por ocasião da sucção da seiva e pode causar diminuição do vigor da planta, desfolhamento, murchamento, manchas cloróticas nas folhas, queda prematura de folhas, levando à redução na produtividade, dependendo das condições nutricionais da planta, enquanto que o indireto pode ser a transmissão de doenças, principalmente as virais (PIETROWKI et al., 2010).

#### Formas de controle

Recomenda-se o plantio de espécies vegetais não hospedeiras de mosca-branca, como algumas gramíneas (milho ou sorgo) intercaladas com as plantas de mandioca. Essa prática pode reduzir as populações da praga. O uso de cultivares mais tolerantes é o método mais indicado para o controle das moscas-brancas. Inseticidas não são recomendados, além de não

haver registro para essa praga na cultura da mandioca no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (FIALHO & VIERA, 2011).

Pulverizações com detergente neutro e óleo vegetal, ambos a 1% de concentração, a cada cinco dias, direcionadas para a parte inferior das folhas, podem reduzir as populações da praga. As aplicações devem começar logo após a constatação dos primeiros surtos e/ou focos da praga. Outras práticas também devem ser observadas como: manter a cultura limpa; não abandonar a cultura afetada, para não servir de criatório das moscas-brancas; destruir os restos culturais após a colheita; adquirir estacas ou manivas-sementes isentas da praga; evitar o plantio próximo às áreas afetadas; evitar trafegar em áreas afetadas; não aproveitar manivas das áreas infestadas pela praga. O fungo *Cladosporium cladosporioides* também pode ser utilizado em pulverização para o controle natural das ninfas (FIALHO & VIERA, 2011).

## 2.5 Cana-de-açúcar

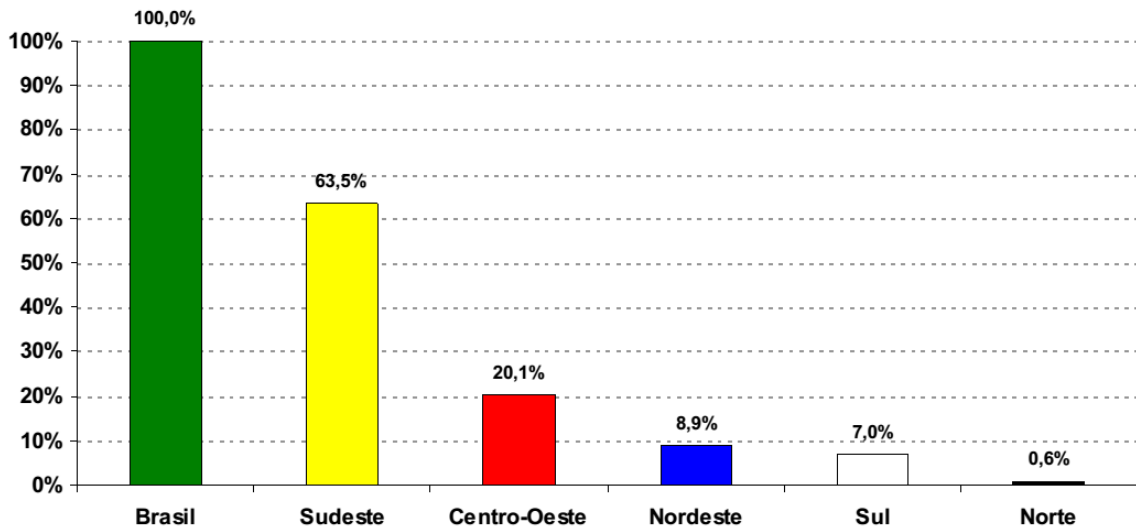
A cana-de-açúcar *Saccharum officinarum* (Linnaeus, 1753) (Poaceae) é uma gramínea semiperene que foi introduzida no Brasil em 1532 e sempre teve importância destacada na economia do país. O país não é só o maior produtor da cultura, seguido por Índia e China, como também o maior produtor de açúcar e etanol de cana-de-açúcar do mundo. Responsável por mais de 50% do açúcar comercializado no mundo, o país teve em 2014 uma redução na sua produção em 2,5%. Apesar de pouco mais de 50% da produção estar concentrada em São Paulo, a cultura é cultivada em todas as regiões do país (CONAB, 2014).

A cana-de-açúcar serve de alimento e fonte de energia renovável, sendo estes os atuais grandes produtos gerados pelo setor sucroenergético. Isso vai ao encontro das necessidades humanas em um cenário de crescimento econômico mundial e necessidade de adoção de fontes renováveis de energia. No Brasil, o setor canavieiro desempenha um papel fundamental na geração de divisas, emprego e superávit da balança comercial. As exportações do complexo sucroalcooleiro ocupam o segundo lugar em valor exportado, superando importantes cadeias como a da carne e a do café, ficando atrás apenas do complexo soja (CONAB, 2014).

O Brasil deverá produzir um total de 654,6 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2015/2016, um acréscimo de 3,1% (19,8 milhões de toneladas) em relação à safra 2014/15, que foi de 634,8 milhões de toneladas. A produção de cana-de-açúcar da região centro-sul está estimada em 592,7 milhões de toneladas, 3% maior que a produção da safra anterior. A Região

Norte/Nordeste deverá ter um aumento de 4,3%, passando de 59,4 milhões de toneladas na safra 2014/15, para 61,9 milhões na safra 2015/16 (CONAB, 2015). A produção agrícola desta cultura sofre forte influência das condições climáticas bem como pela ação de insetos-praga. Estima-se que cerca de 10% das perdas ocasionadas na cultura sejam devidas ao ataque de insetos-praga.

**Gráfico 1** Produção de cana-de-açúcar por região.



Fonte: (CONAB, 2015)

## 2.6 Principais insetos-praga da cana-de-açúcar

Dentre as pragas mais importantes que afetam a cultura no Brasil encontram-se a cigarrinha-da-raiz, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae); bicudo-da-cana, *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae); broca-peluda, *Hyponeuma taltula* (Schaus, 1904) (Lepidoptera: Erebididae), broca-da-cana *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae); broca-pequena-da-cana, *Diatraea flavipennella* (Box, 1931) (Lepidoptera: Crambidae); broca-gigante, *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae); cigarrinha-das-folhas, *Mahanarva posticata* (Stal, 1855) (Hemiptera: Cercopidae) e o besouro-rajado-da-cana, *Metamasius hemipterus* (Linnaeus, 1765) (Coleoptera: Curculionidae) (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA, 2013; LESLIE, 2007).

## 2.7 Broca gigante *Telchin licus* (Drury, 1773)

A broca gigante da cana-de-açúcar pertence à ordem Lepidoptera, subordem Glossata, série Ditrysia (mariposas), superfamília Castnioidea, família castniidae (GALLO et al., 2002).

Os adultos da broca gigante têm cerca de 35 mm de comprimento e 90 mm de envergadura e são de coloração escura ou quase preta, com algumas manchas brancas na região apical e uma faixa transversal branca nas asas anteriores. As asas posteriores apresentam uma faixa curva e transversal de coloração branca e manchas vermelhas na margem externa. No Nordeste do Brasil, os adultos surgem no período do verão, com voo diurno e rápido; as fêmeas, após o acasalamento, efetuam a postura que varia de 50 a 100 ovos, em touceiras velhas, de preferência no meio de detritos e de caules cortados (GALLO et al., 2002).

Os ovos apresentam, inicialmente, uma coloração rosada e, posteriormente, adquirem a coloração verde-azeitona e alaranjada. Possuem 4 mm de comprimento, com cinco arestas longitudinais e apresentam um período de incubação variável de 7 a 14 dias. As lagartas são grandes, com até 80 mm de comprimento e 12 mm de largura do protórax, de coloração branca com algumas pintas pardas no pronoto, sendo que sua largura decresce da parte torácica para a anal. O período larval pode atingir até 10 meses, e as lagartas passam por cinco instares (SILVA JUNIOR et al., 2008).

A pupa se transforma dentro de um casulo feito de fibras de cana-de-açúcar, mede cerca de 4 cm de comprimento com um tempo de duração de aproximadamente 30 a 45 dias, quando emergem os adultos que têm longevidade de 10 a 15 dias (BOTELHO et al., 2006).

**Figura 5** Ciclo biológico da Broca gigante *Telchin licus*.



A- Ovos; B- Lagarta; C- Pupa e D- Adulto da broca gigante. Fonte: (CTC, 2013 com algumas modificações).

A broca gigante danifica a cana abrindo galerias de baixo para cima, até 1/3 da altura do colmo da cana, deixando-o ocado, causando assim perdas na produção agrícola e industrial. Quando acaba a reserva alimentar, a lagarta migra para novo colmo fazendo nova galeria de baixo para cima podendo danificar a touceira resultando em falhas na brotação e em casos de altas infestações, necessidade de reforma do canavial. Outro dano é o conhecido “coração morto” na fase de brotação das soqueiras. O clima influencia o aumento populacional, sendo que melhores distribuições de chuva favorecem o ataque (BENEDINI & CONDE, 2008).

#### Formas de controle

A broca gigante é “praga-chave” da cana e de difícil controle, pois a lagarta fecha o orifício ocado logo após o corte da cana, dificultando o acesso de predadores e tornando ineficiente a aplicação de inseticidas. O controle manual (catação da praga) é o único método eficiente até o momento, porém os custos de mão de obra são elevados. Realizam-se frequentes levantamentos populacionais por amostragem e, quando constatada sua presença, efetua-se o controle manual. A lagarta é coletada manualmente imediatamente após o corte, com auxílio de ferramentas apropriadas, matando-se no primeiro dia até 65% das mesmas. No quinto dia não há mais eficiência de controle, pois ela migra para outro colmo. Numa segunda etapa (45 dias depois), avalia-se o coração morto e retira-se o broto ou perfilho atacado com outro tipo de ferramenta (enxadinha). Se a broca não for controlada desta maneira, o avanço populacional da praga condena o canavial à reforma, pelo elevado número de falhas que podem aparecer (BENEDINI & CONDE, 2008; PINTO et al., 2006).

## **2.8 Resistência de plantas**

A resistência de plantas a insetos pode ser definida como a soma de qualidades hereditárias possuídas pela planta, as quais influenciam no resultado do grau de dano que o inseto causa. Isto, em outras palavras, representa a capacidade que certas plantas possuem de alcançarem maior produção de boa qualidade, que outras variedades em geral, sob condições iguais (LARA, 1998).



## Tipos de Resistência

Uma planta, ou variedade, possui diversos meios para resistir ao ataque de pragas. Esses meios constituem os tipos de resistência. A resistência de planta ao inseto na maioria das vezes afeta os insetos em seu comportamento ou na sua biologia, e em alguns casos ocorre uma simples reação da própria planta sem nenhum efeito direto ao inseto (LARA, 1998). A resistência é classificada em três tipos: antixenose, antibiose e tolerância.

### *Antixenose*

É um dos tipos de resistência de plantas e acontece quando plantas de uma variedade sofre danos menores quando comparada com plantas de outras variedades sob as mesmas condições, sendo esses danos de alimentação, oviposição ou abrigo. Esse tipo de resistência exprime uma mudança no comportamento do inseto em relação à planta (LARA, 1998).

### *Antibiose*

Esse tipo de resistência acontece quando o inseto se alimenta normalmente da planta e esta exerce um efeito adverso sobre a biologia deste inseto, causando assim efeitos diretos no desenvolvimento do inseto, como mortalidade nas fases iniciais, redução de peso e tamanho, redução de fecundidade, além de alterações na reprodução e tempo de vida (LARA, 1998).

### *Tolerância*

Esse tipo de resistência acontece quando as plantas de uma variedade sofrem menos danos em relação as plantas de outras variedades sob o mesmo nível de infestação de uma determinada espécie de inseto, sem afetar o comportamento desse inseto ou sua biologia. Assim as plantas com esse tipo de resistência possuem a capacidade de suportar o ataque da praga, quer seja através da regeneração dos tecidos destruídos, emissão de novos ramos ou perfilhos ou por qualquer outra forma, não deixando que o dano sofrido provoque perdas significativas na sua qualidade e quantidade de produção (LARA, 1998).

## **2.9 Semioquímicos**

Desde a descoberta do primeiro feromônio sexual de inseto em 1959 (BUTENANDT et al., 1959), do bicho da seda *Bombyx mori* (Lepidóptera), as pesquisas referentes ao entendimento da comunicação entre os organismos vivos (insetos, plantas e etc.) vêm numa

crescente até os dias atuais. A maneira como insetos e plantas se comunicam, entre suas espécies e/ou com outras espécies se dá por meio de compostos químicos, e esses compostos receberam o nome de semioquímicos (ZARBIN et al., 2009; HEUSKIN et al., 2011).

A sinalização química entre os indivíduos é claramente um dos primeiros tipos de intercâmbio de informações que aparecem na longa história de vida na terra, muito antes do desenvolvimento dos estímulos visuais ou auditivos. De fato, a forma de comunicação química via semioquímicos continua a ser a forma dominante de comunicação entre muitos animais (SONENSHINE, 2004).

Os semioquímicos são divididos em dois grupos: os feromônios, mediadores intraespecíficos e os aleloquímicos, mediadores interespecíficos. Existem basicamente cinco tipos de feromônios conhecidos: sexual, agregação, alarme, trilha e marcação de hospedeiro (HEUSKIN et al., 2011).

Os aleloquímicos incluem alomônios (espécies que emitem o sinal são beneficiadas), cairomônios (espécie receptora do sinal é beneficiada) e sinomônios (onde emissores e receptores ambos são beneficiados) (HEUSKIN et al., 2011).

Os semioquímicos em geral, consistem em uma ampla variedade de moléculas orgânicas que podem ser de natureza volátil ou não-volátil. Os semioquímicos não-voláteis incluem hidrocarbonetos cuticulares, atuando em reconhecimento do companheiro ou na regulação do canibalismo de várias espécies de insetos (HEUSKIN et al., 2011).

## **2.10 Manejo integrado de pragas (MIP)**

O desenvolvimento de estratégias de manejo integrado de pragas (MIP) vem aumentando em interesse desde que a utilização de pesticidas sintéticos tem causado problemas de saúde e ambientais. Dessa forma os semioquímicos são considerados uma área estratégica do MIP como uma abordagem alternativa ou complementar aos tratamentos com inseticidas. Com efeito, estes compostos espécie-específicos não afetam negativamente os organismos benéficos e não geram qualquer risco de resistência dos insetos-praga como observado com inseticidas (HEUSKIN et al., 2011).

O objetivo do MIP é a utilização de metodologias que tenham a finalidade do controle populacional de insetos-praga permitindo que estes não sejam capazes de causar danos

econômicos e permitindo que os inimigos naturais permaneçam nas plantações favorecendo o equilíbrio natural (TRIANA, 2015).

Entre as principais estratégias para utilização de semioquímicos no MIP estão as seguintes: monitoramento, coleta massal, confusão sexual, push-pull e controle biológico.

#### *Monitoramento*

Armadilhas com feromônios podem ser utilizadas para detectar tanto a presença quanto a densidade da praga, visando determinar quando a população do inseto-praga atingiu o nível de dano econômico. O seu objetivo é determinar de maneira mais precisa o momento de controle e limitar a utilização desnecessária de inseticida, fazendo com que estes sejam utilizados somente quando forem estritamente necessários (ZARBIN et al., 2009; HEUSKIN et al., 2011).

#### *Coleta massal*

Na coleta massal, o feromônio é usado como atrativo do inseto para um recipiente de contenção visando assim a eliminação ou diminuição da população do inseto-praga no cultivo. Geralmente utiliza-se uma grande quantidade de armadilhas com feromônio com o objetivo de capturar o maior número possível de indivíduos (ZARBIN et al., 2009).

#### *Confusão sexual*

Assim como a coleta massal, esta forma de uso de feromônios é um método de controle. O conceito da confusão sexual, confundimento ou ainda interrupção de acasalamento, baseia-se na interferência ou impedimento da transmissão de sinais entre os parceiros sexuais (ZARBIN et al., 2009). A confusão sexual consiste em afetar o comportamento dos machos em sua busca de uma fêmea para o acasalamento pela liberação de grandes quantidades de feromônios sintético de fêmeas na área (HEUSKIN et al., 2011).

#### *Push-pull*

Segundo HEUSKIN et al. (2011), é uma das estratégias mais recentes descritas no MIP. Essa técnica consiste em uma combinação de plantas com estímulos atraentes e repelentes que alteram o comportamento de insetos-pragas e/ou de seus inimigos naturais. Os insetos são desencorajados ou repelidos para longe das culturas (push). Eles são simultaneamente atraídos por iscas (pull) concentradas em outras áreas onde eles serão presos ou mortos de maneira

controlada. Esta estratégia exige uma clara compreensão da biologia das pragas, ecologia química e das interações entre os diferentes níveis tróficos.

### **2.11 Compostos Orgânicos Voláteis de plantas (COVs).**

Os COVs são metabólitos secundários que as plantas liberam, em quantidades não triviais. Quase um quinto do CO<sub>2</sub> atmosférico fixado por plantas na terra, por dia, é liberado como voláteis (BALDWIN, 2010).

Segundo Maffei (2010), cerca de 90% das emissões dos COVs vindas de fontes naturais são liberadas pelas florestas, sendo a mais importante entre estas a floresta amazônica. Esses compostos não são liberados por acaso. Eles desempenham funções importantíssimas na comunicação entre as plantas e com outros organismos. Na natureza, as plantas desenvolveram e aperfeiçoaram uma diversidade considerável de mecanismos de defesa contra condições ambientais adversas, tais como o ataque de macro e microrganismos antagonistas, entre eles a emissão dos COVs (ZARBIN et al., 2013).

A composição química dessas misturas de voláteis liberados pelas plantas e sua intensidade podem carregar informações sobre o estado fisiológico e algum estresse a que elas estão sendo submetida (DUDAREVA, 2006). Segundo DUDAREVA & PICHERSKY (2008), as principais funções dos COVs liberados por plantas estão ligadas às defesas contra herbívoros e patógenos, atração de polinizadores, dispersores de sementes e microrganismos benéficos, além de servirem como sinais de comunicação entre as plantas.

Mais de 1% destes metabólitos secundários liberados por plantas são moléculas lipofílicas com baixo ponto de ebulição. Eles são representados principalmente por terpenóides, fenilpropanóides/benzenóides, derivados de ácidos graxos e derivados de aminoácidos (DUDAREVA & PICHERSKY, 2008). Os COVs são liberados na atmosfera pelas folhas, flores, frutos e as raízes das plantas (MAFFEI, 2010).

Em resposta ao ataque de herbívoros, as plantas emitem uma mistura de COVs que podem ser quantitativa e qualitativamente diferentes das misturas emitidas quando estão intactas. Esta mistura de voláteis quando induzida, altera as interações entre a planta e o seu ambiente (DICKE & LOON, 2000). Esses COVs podem variar de acordo com o tipo de dano

seja, fermento único, fermento contínuo, deposição de ovos e alimentação de herbívoros (MAFFEI, 2010).

Na natureza, os voláteis têm muitas funções eco-fisiológicas. Constitutivamente, eles oferecem à planta defesa contra agentes de stress e permitem a comunicação entre a planta e o meio ambiente. Além disso, protegem a planta do calor ao reduzir espécies de oxigênio reativas produzidas por altas temperaturas, protegem as plantas de micro-organismos e repelem insetos. Os voláteis também mediam interações entre plantas e herbívoros, as quais são importantes, já que vinculam cadeias alimentares em ecossistemas complexos. Eles mediam a atração de polinizadores às flores e possivelmente de animais disseminadores de sementes assim como a localização de plantas hospedeiras por insetos herbívoros. Já os voláteis induzidos provocam a atração de inimigos naturais (predadores e parasitoides) tanto na parte aérea, como nas raízes das plantas estando também envolvidos nas interações planta-planta (ZARBIN et al., 2013).

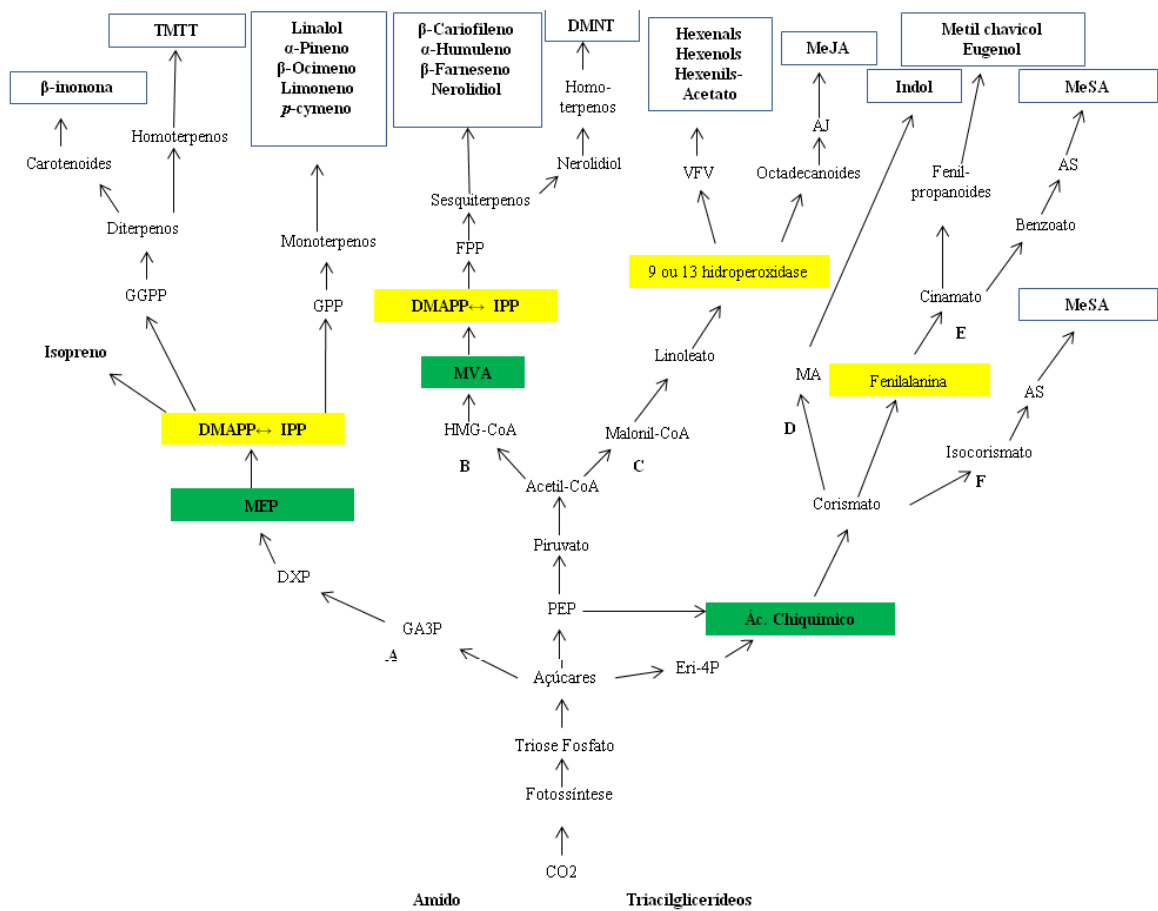
## **2.12 Localização da biossíntese de COVs em plantas**

Os COVs particularmente a maioria dos monoterpenos e sesquiterpenos, são sintetizados e armazenados em tecidos secretores especiais, que estão presentes na maioria das plantas vasculares (MAFFEI, 2010). Muitos dos voláteis lipofílicos de plantas são liberados através das membranas dos tecidos epidérmicos, onde são sintetizados, ou de outras estruturas, tais como tricomas que são estruturas especializadas semelhantes a pêlos, derivados de células epidérmicas (BALDWIN, 2010). Esses tricomas estão presentes na superfície das plantas, em muitos casos os COVs são acumulados dentro da camada cuticular, mas fora da parede celular da planta, quer sozinhos ou juntos com outros compostos que podem ter natureza química muito distinta (MAFFEI, 2010). Além dos tricomas, há a presença de outras estruturas secretoras que são menos visíveis, porque estão inseridas em tecidos profundos das plantas onde os COVs são armazenados, representando uma defesa constitutiva, pronta para serem liberados ou agir em caso de ruptura dos tecidos (MAFFEI, 2010). Em raízes e flores, os COVs são armazenados em outros tecidos, onde os produtos se acumulam e são secretados dentro de seus vacúolos, sendo armazenados em formas conjugadas ou em dutos e laticíferos especializados, que são precursores conjugados para liberação como voláteis quando os tecidos forem danificados (por exemplo, quando herbívoros mastigam folhas). Ao ocorrer o dano, enzimas líticas são misturadas com o conteúdo destes compartimentos de armazenamento e os voláteis são liberados (BALDWIN, 2010).

### 2.13 Principais Rotas Biosintéticas de COVs

A biossíntese de COVs depende da disponibilidade de carbono, de nitrogênio e de enxofre, bem como a energia fornecida pelo metabolismo primário da planta. Por isso, a disponibilidade destes componentes básicos exercerá um grande impacto sobre a concentração de qualquer metabólito secundário, incluindo os COVs, demonstrando assim o elevado grau de conectividade entre o metabolismo primário e secundário. Com base na sua origem biosintética, todos os compostos orgânicos voláteis são divididos em classes, incluindo terpenoides, fenilpropanoides/benzenoides, derivados de ácidos graxos e derivados de aminoácidos (DUDAREVA, 2013). A Figura 8 exemplifica as principais vias biosintéticas dos COVs produzidos por plantas.

**Figura 6 Principais rotas Biosintéticas de COVs produzidos por plantas.**



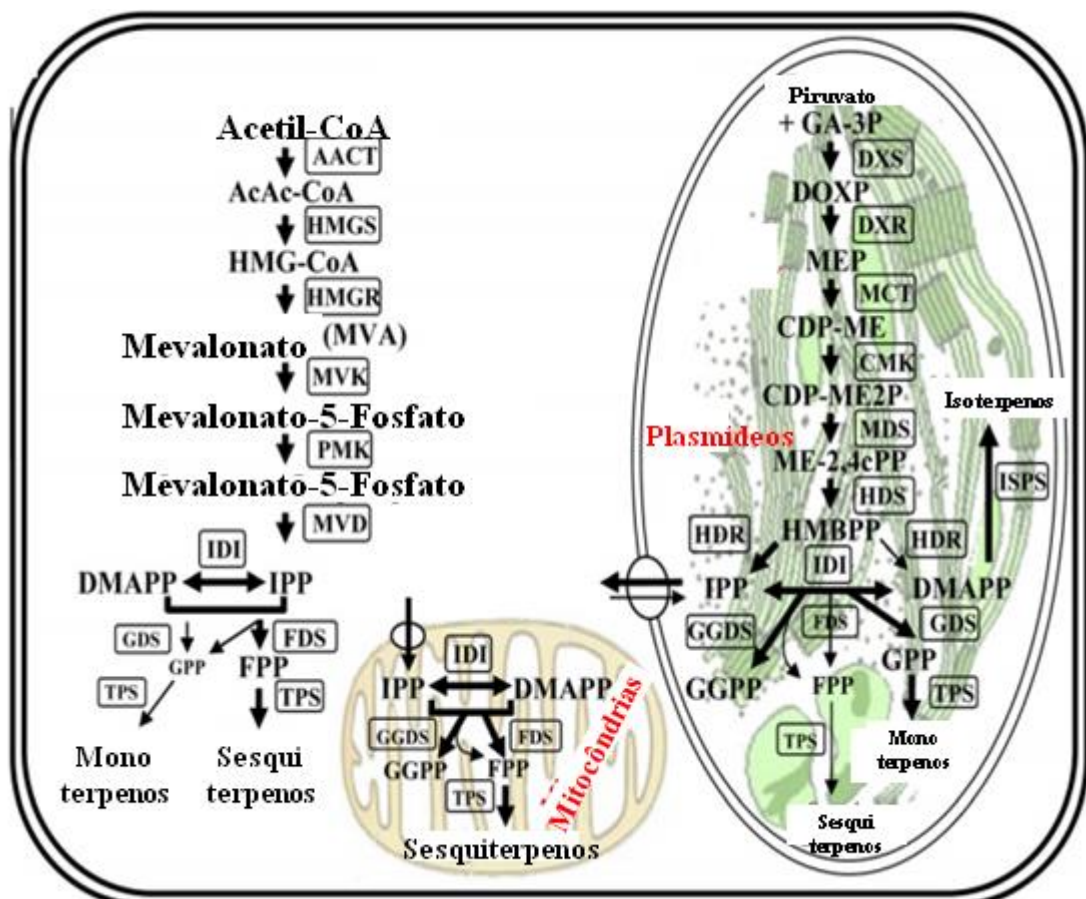
Fonte: (MAFFEI, 2010 com algumas modificações)

## 2.14 Biossíntese de Terpenóides

Os terpenóides fornecem uma grande parte da diversidade estrutural na mistura de compostos voláteis de plantas. Todos os terpenóides são derivados da condensação de precursores  $C_5$  isopentenil pirofosfato (IPP;  $C_5$ ) e o seu isômero alílico, difosfato de dimetilalila (DMAPP;  $C_5$ ). Esses compostos são sintetizados por duas vias independentes: a via do ácido mevalônico (MVA), localizada no citosol ou a via do 2-metil-4-fosfato de eritritol/1-desoxi-xilulose 5-fosfato (MEP/DOXP) via esta localizada nos plastídios (BALDWIN, 2010).

Segundo DUDAREVA (2013), a via MVA dá origem aos sesquiterpenos voláteis ( $C_{15}$ ), enquanto que a via MEP proporciona precursores para hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ) e diterpenos ( $C_{20}$ ) voláteis.

Figura 7 Rotas Biosintética dos terpenóides em plantas.



Fonte: (NAGEGOWDA, 2010)

A via do MVA começa com a condensação de duas moléculas de acetil-Coenzima-A para acetoacetil-CoA (AcAc) pela enzima AcAc-tiolase (AACT) (NAGEGOWDA, 2010).

A molécula resultante das condensações de três acetil-coA é a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMGR), que sofre redução para ácido mevalônico (MVA), que em seguida sofre duas reações de fosforilação, além de descarboxilação e eliminação, gerando o produto final o pirofosfato de isopentenila (IPP). Esse produto ainda sofre a ação da enzima isopentenil-difosfato-isomerase formando o difosfato de dimetilalila (DMAPP) (DUDAREVA, 2013; NAGEGOWDA, 2010).

A via MEP consiste em sete etapas enzimáticas envolvidas na formação de IPP e DMAPP. A primeira etapa nesta via é a condensação de piruvato e gliceraldeído 3-fosfato (GAP) para formar uma desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DOXP) pela ação da enzima DOXP-sintase (DXS). A DOXP sofre redução e isomerização pela ação de uma enzima conhecida como MEP-sintase levando à formação do MEP. Esse MEP passa por cinco etapas consecutivas até ocorrer a conversão de MEP para IPP e DMAPP. Essa via depende do metabolismo primário para o fornecimento de Piruvato e GAP, derivados tanto da glicólise, quanto da via da pentose fosfato (PPP) (DUDAREVA, 2013; NAGEGOWDA, 2010).

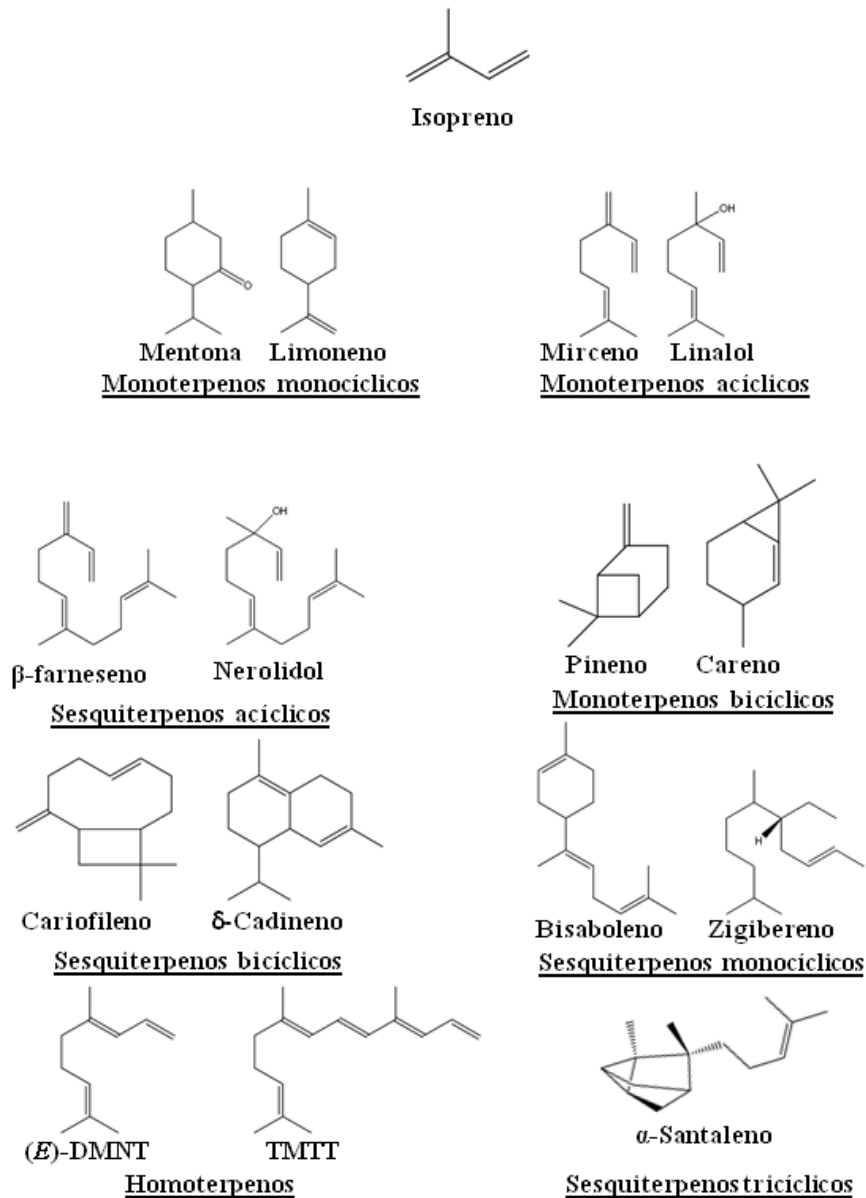
Ambos IPP e DMAPP são substratos para as enzimas prenil-transferases de cadeia curta, que produzem precursores difosfato de prenila, difosfato de geranila (GPP), difosfato de farnesila (FPP) e difosfato de geranylgeranila (GGPP) para uma grande família de terpeno-sintases/ciclases (TPSs). Enquanto a via do MVA produz apenas IPP, a via MEP sintetiza ambos IPP e DMAPP. Assim, as duas vias dependem da difosfato-de-isopentenila-isomerase (IDI), que converte reversivelmente IPP para DMAPP e que controla o equilíbrio entre eles (DUDAREVA, 2013).

Esses precursores são os componentes básicos utilizados pelas terpeno sintases (TPSs), que produzem uma enorme gama de hemi-, homo-, sesqui- e diterpenos voláteis. Uma dessas enzimas pode usar o substrato para formação de um até vinte produtos diferentes (BALDWIN, 2010). A formação do precursor dos sesquiterpenos acontece pela condensação de duas moléculas de IPP com uma de DMAPP levando à formação do FPP. Isso acontece no citosol, enquanto que nos plastídios as GPP e GGPP sintases são responsáveis pela condensação cabeça-de-cauda de uma molécula DMAPP com uma ou três moléculas IPP para formar GPP e GGPP, respectivamente, os precursores correspondentes de mono e diterpenos (DUDAREVA, 2013). Os terpenóides com número de carbonos irregulares podem ser produzidos através da modificação da via terpenoide ( $C_{11}$  e  $C_{16}$  homoterpenes), bem como através da degradação de carotenoides um processo inicial de uma clivagem por uma



dioxigenase seguida de outras transformações enzimáticas (BALDWIN, 2010; DUDAREVA, 2013).

**Figura 8** Principais terpenóides liberados por plantas.



Fonte: (ZARBIN et al., 2010)

## 2.15 Compostos epicuticulares de insetos

Os hidrocarbonetos de cadeia longa de insetos desempenham um papel central na impermeabilização da cutícula dos insetos. Além disso, apresentam uma função extensa na comunicação química onde são necessárias substâncias químicas relativamente não voláteis (BLOMQUIST, 2010). Esses hidrocarbonetos podem atuar como semioquímicos, apresentando

várias atividades, entre elas: atrativos sexuais, pistas de reconhecimento de castas, marcação de território, recrutamento e feromônios de alarme, secreções de defesa, cairomônios, entre outros (BLOMQUIST, 1982).

### **2.16 Sítio de biossíntese dos hidrocarbonetos epicuticulares**

Há uma variedade de linhas de evidências que os locais da síntese de hidrocarbonetos aconteçam nos oenócitos (BLOMQUIST, 2010). A localização anatômica dos oenócitos varia entre as espécies de insetos e até mesmo nos diferentes estágios de desenvolvimento. Em alguns insetos, tais como *Tenebrio molitor*, oenócitos estão dispostos em grupos discretos dentro da hemocele e são facilmente acessíveis. Em outros insetos, incluindo a barata, *Periplaneta americana*, a mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster*, e a barata alemã, *Blatella germânica*, os oenócitos são encontrados dentro do tegumento abdominal.

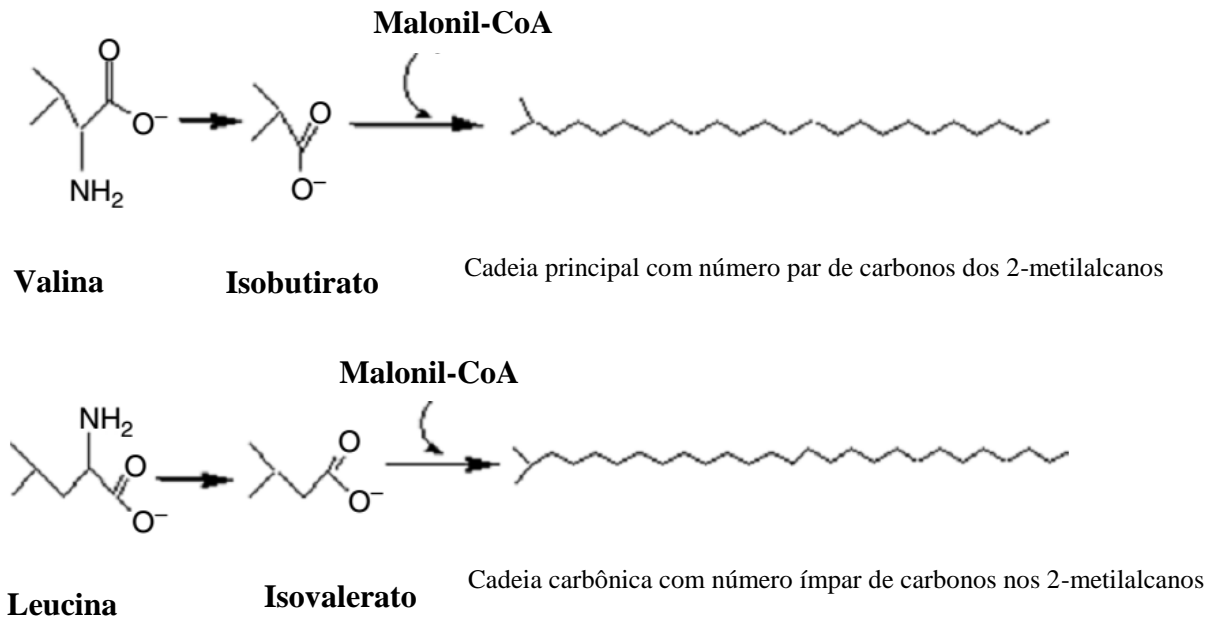
### **2.17 Vias biossintéticas dos hidrocarbonetos**

Recentemente, elucidou-se o mecanismo de como os insetos sintetizam hidrocarbonetos Acil-CoAs para produzir os ácidos graxos de cadeia longa, que são então convertidos em hidrocarbonetos por perda do grupo carboxila. Hidrocarbonetos metil ramificados (com a exceção dos 2-metilalcanos) resultam na incorporação de um grupo propionil-CoA (como o metilmalonil-CoA) no lugar de um grupo acetil-CoA em pontos específicos durante o alongamento da cadeia. Já os 2-metilalcanos surgem a partir do alongamento do esqueleto de carbono da valina (com o mesmo número de átomos de carbono na cadeia) ou na isoleucina (com número ímpar de átomos de carbono na cadeia) (BLOMQUIST, 2010).

### **2.18 Biossíntese de hidrocarbonetos Metil-Ramificados**

A formação dos 2-metilalcanos surge a partir de esqueletos carbônicos de aminoácidos para iniciar a síntese da cadeia do composto. Quando a valina é usada como percussor nessa síntese, a cadeia principal do composto que será formado apresentará um número par de átomos de carbono, e se a leucina for usada para a síntese do composto, a cadeia principal desse composto apresentará o número ímpar de átomos de carbonos, como apresentado na figura 9.

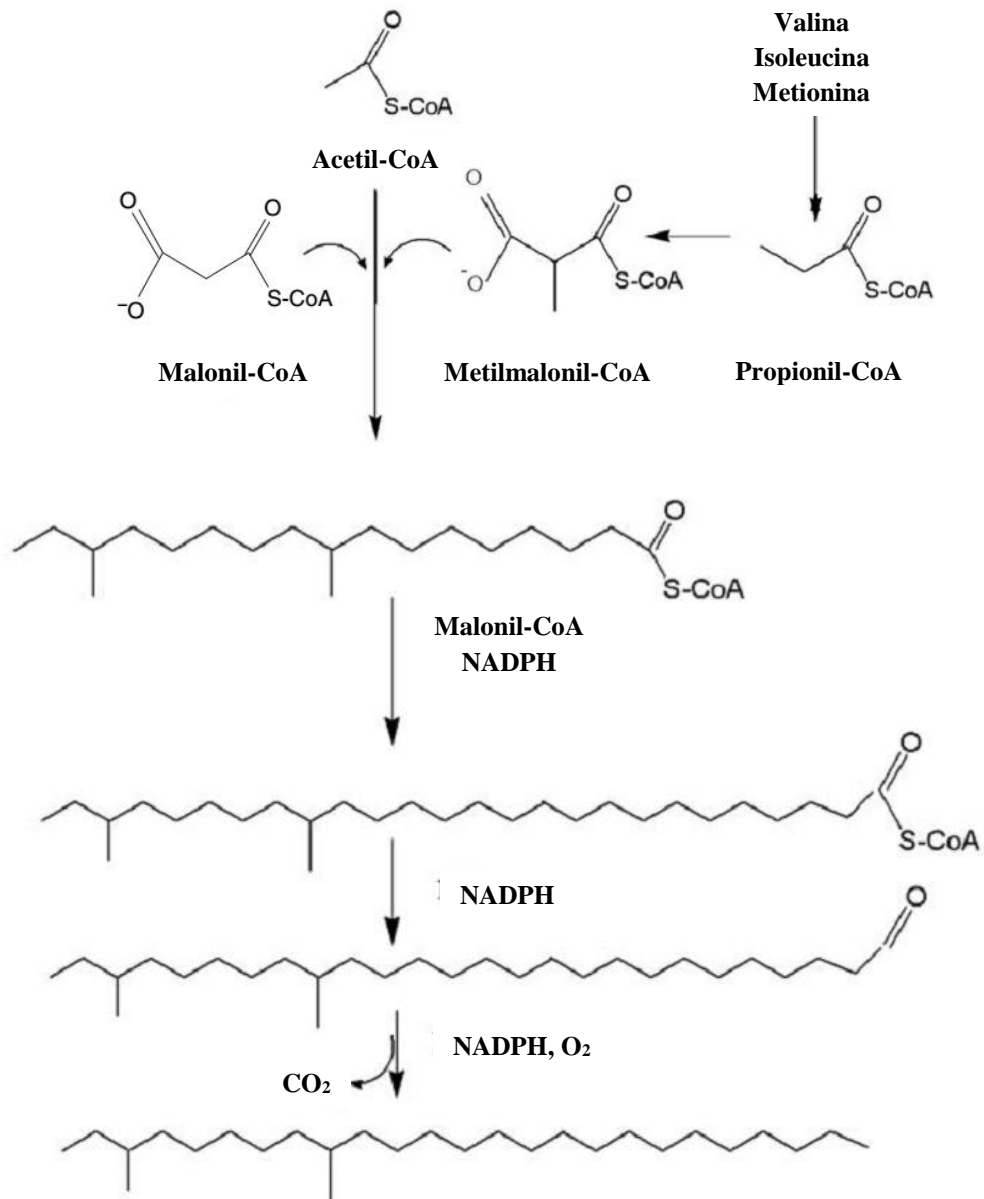
**Figura 9** Biossíntese de 2-metil-alcanos utilizando os esqueletos carbônicos de leucina e valina.



Fonte: (BLOMQUIST, 2010)

Assim, as ramificações metila ocorrem na posição C-3, além de apresentarem outra ramificação mais interna nos hidrocarbonetos nesta classe de compostos, sendo estes formados a partir da substituição de uma unidade de metilmalonil-CoA por uma unidade de malonil-CoA, durante o processo de alongamento da cadeia. Os precursores para a síntese de metil malonil-CoA em insetos, especialmente na ausência ou em baixos níveis de vitamina B12, são os aminoácidos valina, isoleucina e metionina. A valina e isoleucina também são os precursores para o grupo propionil que dá origem a hormônios juvenis e aos compostos etil-ramificados na ordem Lepidoptera (BLOMQUIST, 2010).

**Figura 10** Via Biosintética de hidrocarbonetos metil-ramificado.



Fonte: (BLOMQUIST, 2010).

Os cupins (*Zootermopsis angusticollis*) apresentam altos níveis de vitamina B12, em contraste com a maioria dos outros insetos. Nos cupins, o succinato é convertido em metilmalonil-CoA, servindo como a fonte de ramificações metila. A succinil-CoA é convertida a metilmalonil-CoA no trato intestinal, sendo posteriormente convertida a propionato, provavelmente através de microrganismos. Esse propionato de etila, em seguida, é, aparentemente, transportado pela hemolinfa do tecido epidérmico, onde é reconvertido a metilmalonil-CoA para ser utilizado na síntese de hidrocarbonetos metil-ramificados (BLOMQUIST, 2010).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Perfil dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de diferentes cultivares de Mandioca

##### 3.1.1 Obtenção e manutenção das plantas e dos insetos.

Para avaliação dos COVs da mandioca foram utilizadas duas cultivares, sendo uma considerada resistente (Equador 72) e a outra susceptível (BRS JARI). O material foi previamente caracterizado em campo como resistente ou suscetível ao percevejo-de-renda (*Vatiga illudens*), ácaros e mosca-branca (Dr. Éder Jorge de oliveira – Comunicação pessoal), as cultivares foram cedidas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, Bahia). Esse material foi propagado a partir de manivas em copos plásticos de 0,5 litros com substrato comercial, irrigação manual e mantido em casa de vegetação sob condições de temperatura e umidade ambiente.

**Figura 11** Copos plásticos com as plantas das duas cultivares de mandioca (Equador 72 e BRS JARI).



(Foto: Thyago Ribeiro, 2015)

Adultos do percevejo-de-renda foram obtidos em campo na fazenda KAPA, (Limoeiro de Anadia, Alagoas). Após a coleta, os insetos foram mantidos em mudas de outra cultivar não identificada de mandioca.

Os adultos de mosca-branca foram coletados em plantas de mandioca em campo, na Unidade de execução de pesquisa da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizada no Centro de Ciências Agrárias (CECA) da UFAL, em Rio Largo, Alagoas. As moscas-brancas foram coletadas, utilizando sugadores e armazenados em frascos âmbar de 5 mL a temperatura ambiente, permanecendo por 1 hora sem qualquer fonte de alimento até utilização nos bioensaios de atividade.

### 3.1.2 Coleta dos compostos orgânicos voláteis das plantas.

Todas as plantas que foram utilizadas para coleta dos COVs tinham entre quarenta a quarenta e cinco dias de cultivo. As plantas das duas cultivares foram infestadas com 10 percevejos por planta, denominando-se tratamento infestado. As plantas controle foram mantidas sem infestação. Para as coletas dos COVs foi utilizado o adsorvente Haysep. As plantas foram acondicionadas dentro de sacos de poliéster para uso em forno e seus vasos foram cobertos com papel alumínio para isolar os compostos provenientes do solo. Ar filtrado com carvão ativo foi injetado através de uma bomba em um fluxo de 800 mL/min enquanto que outra bomba sugava o ar passando através do “trap” a uma razão de 400 mL/min. As coletas foram realizadas por 60 horas e em seis repetições por tratamento. Ao término das aerações, a dessorção dos compostos foi realizada passando-se 500  $\mu$ L de hexano bidestilado pelos traps contendo os voláteis, e as amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a análise.

**Figura 12** Coleta dos COVs de plantas das duas cultivares de mandioca (Equador 72 e BRS JARI).



(Foto: Thyago Ribeiro, 2015)

### 3.1.3 Análises dos COVs

As amostras obtidas através das aerações dos diferentes tratamentos realizados para as duas cultivares equador 72 e BRS JARI foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). As amostras foram injetadas no CG/EM modelo 2010 PLUS, Shimadzu, em uma coluna Nist-05 (5% Fenil, 95% Dimetilpolisiloxano) com (30 m, d. 0,25 mm). As condições do método usado foram as seguintes: injetor com a temperatura 200°C no modo Splitless (sem divisão de fluxo), a coluna iniciando com 50°C por 5 minutos, seguido por gradiente de 5°C/min até atingir 250°C, que foi mantido por 5 minutos. A fonte de ionização utilizada foi impacto eletrônico (EI) com 70 eV (elétrons-volts), com a temperatura do detector “ion source” de 200°C. A temperatura da interface foi de 250°C, os valores de fragmentação registrados foram Scan de 35 m/z até 300 m/z e o tempo total da corrida foi 50 minutos.

Depois de injetadas as amostras e obtidos os cromatogramas, estes foram analisados e os possíveis compostos identificados usando-se as bibliotecas de espectros de massa NIST (National Institute of Standards and Technology), Wiley library, que compõem o pacote do software do equipamento. Consideraram-se os compostos que apareceram em mais de 50% das amostras analisadas e, para identificação, um limite mínimo de 80% de similaridade entre os espectros de massa foi utilizado juntamente com os resultados dos Índices de Retenção de Kovats (KI) que foram calculados usando um padrão de alcanos de C7 a C30, utilizando a seguinte equação:

$$KI = 100 * n + 100 * (N - n) * \frac{t_{rx} - t_{rn}}{t_{rN} - t_{rn}}$$

Onde **n** o número de átomos do alcano mais próximo eluído antes do analito, **N** número de átomos do alcano mais próximo eluído após o analito e o **t<sub>rx</sub>** é o tempo de retenção do analito, **t<sub>rn</sub>** o tempo de retenção do alcano mais próximo eluído antes do analito, **t<sub>rN</sub>** tempo de retenção do alcano mais próximo eluído após o analito.

Os valores de KI calculados foram comparados com valores de KI descritos na base de dados Pherobase para confirmar os possíveis compostos presentes nas amostras analisadas.

### 3.1.4 Quantificação do padrão

O padrão de  $\beta$ -ocimeno utilizado foi a mistura racêmica (Sigma Aldrich). Construiu-se uma curva padrão para quantificação do  $\beta$ -ocimeno encontrado nas plantas. A curva foi obtida utilizando cinco concentrações seriadas variando entre 10 a 1000 ng de  $\beta$ -ocimeno por mL. Injetou-se 1  $\mu$ L no modo auto-injetor em condições cromatográficas semelhantes às descritas no item 3.1.3.

### 3.1.5 Bioensaios de repelência da mosca-branca frente aos COVs de mandioca

Para os bioensaios de repelência da mosca-branca, foram testados os extratos de COVs das duas cultivares. Utilizou-se um pool das amostras de cada tratamento e a concentração dos extratos foram ajustadas (diluídas) para que os extratos das plantas infestadas tivessem uma concentração de 250 ng/mL de  $\beta$ -ocimeno, o que é encontrado nos 25  $\mu$ L usados no bioensaio a quantidade de  $\beta$ -ocimeno liberado por planta (infestada) durante 60 horas. Para o bioensaio, foi adotada modificação da metodologia descrita por (ZHANG et al., 2004).

Para o bioensaio, usaram-se, como olfatômetro, cilindros de vidro que continham um diâmetro interno de 2,2 cm e comprimento de 30 cm. Na tampa de vidro, foi montado um “sanduíche” colocando-se nesta ordem: um disco de papel filtro, um disco de folha de mandioca, um anel de teflon de 2,1 cm de diâmetro e uma tela antiafídica. A tampa foi então colocada e mantida nessa ordem na extremidade superior do cilindro que estava orientado verticalmente embaixo de uma fonte de luz. Antes da montagem, o disco de papel filtro foi umedecido com 20  $\mu$ L de água destilada para impedir que os discos de folha de mandioca se desidratassem durante experimento que teve uma duração de 1 hora.

O uso da tela antiafídica impediu que aparelho bucal da mosca-branca entrasse em contato com o disco das folhas da mandioca. O uso do anel de teflon impediu que qualquer substância aplicada sobre os discos das folhas entrasse em contato com a tela de antiafídica, causando assim uma possível dispersão das moscas-brancas para o lado do olfatômetro. Esse cuidado foi necessário para que nada pudesse causar algum efeito sobre a resposta das moscas-brancas, a não ser unicamente a volatilidade da substância aplicada e da sua percepção através do olfato.

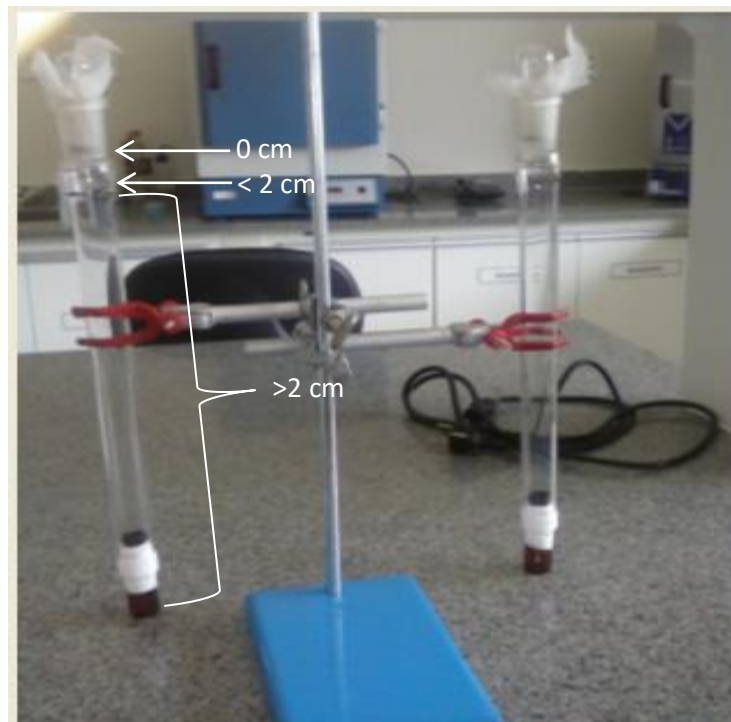
Foram realizados ensaios preliminares para encontrar o melhor volume a ser testado no sistema, chegando-se a um volume ótimo. Utilizou-se para cada repetição um volume de 25  $\mu$ L do pool dos extratos e do padrão sintético. Os bioensaios foram realizados usando discos de



folhas de plantas de mandioca de outra cultivar. As moscas-brancas foram introduzidas na parte inferior do cilindro. Durante um período de exposição de 1 h, as localizações das moscas-brancas dentro do cilindro foram registrados como repousando sobre a tela anti-afídica (0 cm), repousando sobre as paredes do cilindro a partir da tela até 2 cm (< 2 0 cm), e de repouso sobre as paredes do cilindro a partir de 2 cm ao fundo do cilindro (> 2 cm). Foram utilizadas dez moscas por cilindro, sendo a sua localização no cilindro registrada após 1 hora. As repetições dos bioensaios foram sempre realizadas no período da manhã (8 - 12h am) e dez repetições foram utilizadas para cada tratamento.

Foram armazenados em etanol 10 exemplares de adultos e ninfas das moscas-brancas coletadas no campo para envio a especialista para identificação.

**Figura 13** Olfatômetro utilizado nos bioensaios de repelência.



(Foto: Thyago Ribeiro, 2015)

### 3.1.6 Análise estatística

Para a análise estatística dos COVs de mandioca, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos, duas cultivares (controle e infestado) e seis repetições. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias

de Tukey a 5% de probabilidade. Para os bioensaios com a mosca-branca foi também realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### **3.2 Compostos epicuticulares da Broca Gigante (*T. licus*)**

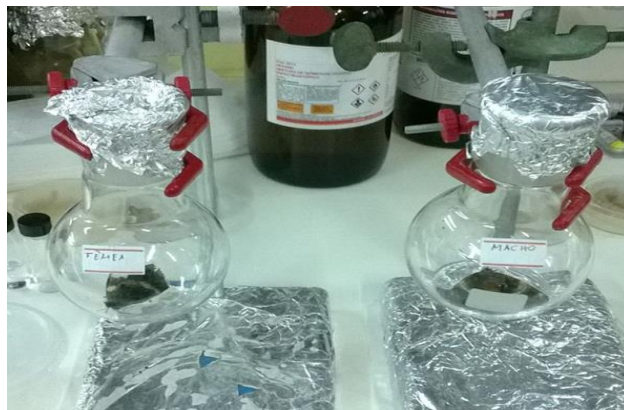
#### **3.2.1 Obtenção dos Insetos**

As lagartas de broca gigante foram coletadas em campo, pertencente à Triunfo Agroindustrial Ltda, localizado no município de Boca da Mata, Alagoas. Os insetos foram coletados manualmente pela equipe técnica da própria usina, sendo logo após, colocadas em placas de petri de polietileno e mantidas em dieta artificial. Após a coleta, as larvas foram levadas ao Laboratório de Pesquisa em, Recursos Naturais (LPQRN) e mantidas nas seguintes condições: temperatura de  $27\pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $81\pm 3\%$  e fotoperíodo invertido de 14 h fotofase e 10 h escotofase. A manutenção foi feita semanalmente, trocando-se a alimentação e fazendo o acompanhamento de mudança de fase. Diariamente, as larvas que passavam para o estágio de pupas, foram sexadas, separadas em gaiolas (40 cm x 40 cm) e mantidas em recipiente contendo papel filtro umedecido. Após aproximadamente 15 dias na fase de pulpa os adultos emergiam, chegando ao seu último estágio em laboratório.

#### **3.2.2 Extração dos epicuticulares das lagartas e adultos da Broca gigante.**

As lagartas de aproximadamente 3 a 4 cm foram retiradas das dietas e alimentadas com cana-de-açúcar por um período de 24 horas. Após esse período, foram colocadas em balões para extração dos compostos epicuticulares. Foram utilizadas cinco lagartas para cada amostra, sendo realizadas cinco repetições. Já para a extração dos compostos cuticulares dos adultos (macho e fêmeas separadamente), foi utilizado um adulto de cada sexo para cada amostra, também utilizando-se 5 repetições. O solvente utilizado para extração dos compostos cuticulares foi o hexano grau HPLC bidestilado, num volume de 5 mL para cinco lagartas e 5 mL para cada adulto. Tanto lagartas como os adultos ficaram imersos durante um período de cinco minutos no solvente. Após esse tempo, o material foi retirado e eluído em uma coluna de sílica gel com as seguintes especificações: Analyticals mm 0,05÷0,20 RS cromatografia, densidade (g/L) 400÷440. As amostras foram armazenados em vials de 1,5 mL a  $-20^\circ\text{C}$  para análise posterior.

**Figura 14** Extração de compostos epicuticulares de broca gigante.



(Foto: Thyago Ribeiro, 2015)

### **3.2.3 Análise dos compostos epicuticulares das lagartas e adultos da Broca gigante.**

As amostras obtidas através da extração dos compostos epicuticulares de lagartas e adultos machos e fêmeas da broca gigante foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). As amostras foram injetadas em CG/EM de modelo 2010 PLUS, Shimadzu, em coluna Nist-01 (100% dimetilpolisiloxano) com (30 m, d. 0,25 mm). Foram usados diferentes métodos para lagartas e adultos. O método usado na identificação dos compostos das lagartas foi: injetor com a temperatura 250°C no modo Split (com divisão de fluxo), a coluna iniciando com 50°C por 5 minutos, seguido por gradiente de 8°C/min até atingir 300°C, que foram mantidos por 15 minutos. A fonte de ionização utilizada foi impacto eletrônico (EI) com 70 eV (elétrons-volts), com a temperatura do detector “ion source” de 200 °C, temperatura da interface de 250°C. Os valores de fragmentação registrados foram Scan de 35 m/z até 500 m/z, e o tempo total da corrida foi 51,25 minutos.

O método utilizado para as análises de ambos os adultos machos e fêmeas foi: injetor com a temperatura 250°C no modo Splitless (sem divisão de fluxo), a coluna iniciando com 140°C por 3 minutos, seguido por gradiente de 4°C/min até atingir 300°C, que foram mantidos por 5 minutos. A fonte de ionização utilizada foi impacto eletrônico (EI) com 70 eV (elétrons-volts), com a temperatura do detector “ion source” de 200 °C, a temperatura da interface de 290 °C. Os valores de fragmentação registrados foram Scan de 35 m/z até 500 m/z, e o tempo total da corrida foi 48,25 minutos.

Após injetadas as amostras e obtidos os cromatogramas, realizou-se a análise e os possíveis compostos foram identificados utilizando-se as bibliotecas de espectro de massas NIST (National Institute of Standards and Technology) e Wiley library, que compõem o pacote do software do equipamento. Foram considerados os compostos que apareceram em mais de 50% das amostras analisadas e, para identificação, considerou-se um limite mínimo de 80% de similaridade entre os espectros de massa das bibliotecas. Além disso, foram calculados os Índices de Retenção de Kovats (KI), com padrão de alcanos de C7 a C30, utilizando-se a seguinte equação:

$$KI = 100 * n + 100 * (N - n) * \frac{t_{rx} - t_{rn}}{t_{rN} - t_{rn}}$$

Onde **n** o número de átomos do alcano mais próximo eluído antes do analito, **N** número de átomos do alcano mais próximo eluído após o analito e o **t<sub>rx</sub>** é o tempo de retenção do analito, **t<sub>rn</sub>** o tempo de retenção do alcano mais próximo eluído antes do analito, **t<sub>rN</sub>** tempo de retenção do alcano mais próximo eluído após o analito.

Os valores de KI calculados foram comparados com valores de KI descritos na base de dados Pherobase para confirmar os possíveis compostos presentes nas amostras analisadas.

### 3.2.4 Atividade antimicrobiana dos compostos epicuticulares

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada utilizando o teste de difusão em discos com adaptação do método previamente descrito (Manual Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI). Nos bioensaios antimicrobianos, foi testada a eficiência dos compostos cuticulares das lagartas da broca gigante frente a quatro microrganismos endofíticos isolados de cana-de-açúcar, previamente identificados como *Pectobacterium corotovorum* (X), *Bacillus cereus* (O), *Bacillus pumilus* (C) e não-identificado (G). Foram utilizadas quatro concentrações para os extratos dos compostos epicuticulares de: 1; 2,5; 5 e 10 mg/mL dissolvidas em hexano.

Ajustou-se a turbidez da cultura em crescimento com solução salina estéril, de modo a obter-se uma turbidez óptica comparável à da solução padrão de McFarland a 0,5. (escala n°5, em seguida diluído 1:10 v/v em salina para o vol. final de 5 mL). Em condições ideais, mergulhou-se um swab de algodão estéril na suspensão ajustada e assim semeado. Na superfície seca da placa de ágar Müeller-Hinton foi inoculado esfregando o swab em toda a superfície

estéril do ágar. Repetindo-se o procedimento esfregando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, assegurando assim uma distribuição uniforme do inóculo.

Foram usados cinco discos estéreis de papel filtro em cada placa, sendo embebecidos com 20µL das diferentes concentrações dos compostos epicuticulares, além do controle (hexano). Cada disco foi pressionado de encontro à placa, de maneira a assegurar contato completo com a superfície do ágar. As placas foram invertidas e colocadas numa estufa, a 35°C. Após 24 horas de crescimento, os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco, para classificar a atividade dos compostos. O ensaio foi realizado em triplicata para todos os isolados.

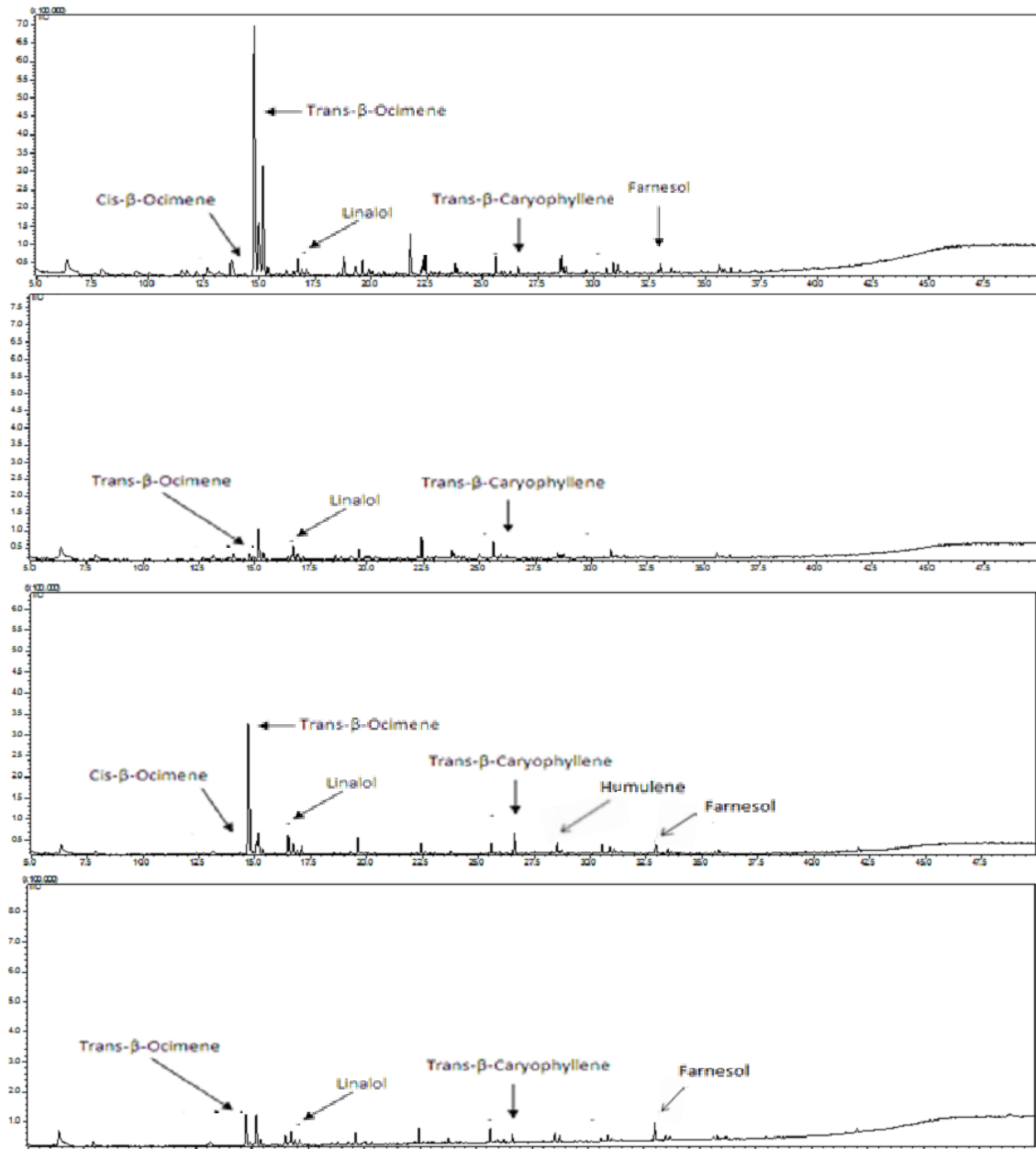
## 4. RESULTADOS

### 4.1 COVs de *Manihot esculenta*

#### 4.1.1 Identificação do perfil dos COVs das cultivares de mandioca.

A análise dos resultados da identificação dos COVs das cultivares Equador 72 e BRS Jari de mandioca mostraram uma grande variedade de compostos de diversas classes, como terpenos, alcanos, alcanos ramificados, alcenos, cetonas, aldeídos, álcoois entre outros. A figura abaixo mostra os perfis cromatográficos das duas cultivares e os tratamentos controle e infestado.

**Figura 15** Cromatogramas obtidos por CG-MS dos extratos de voláteis demonstrando o perfil dos COVs das duas cultivares de *M. esculenta*.



(A) cultivar Equador 72 controle; (B) cultivar BRS Jari controle; (C) cultivar Equador 72 infestada com *Vatiga illudens* e (D) cultivar BRS Jari infestada com *V. illudens*.

Como apresentado na figura 15, a cultivar Equador 72 apresentou tanto nas plantas controle quanto nas plantas infestadas um número maior de COVs, além de uma maior intensidade destes, quando comparada com a cultivar BRS Jari.

**Tabela 1** As classes encontradas e seus compostos presentes nas duas cultivares em seus dois tratamentos.

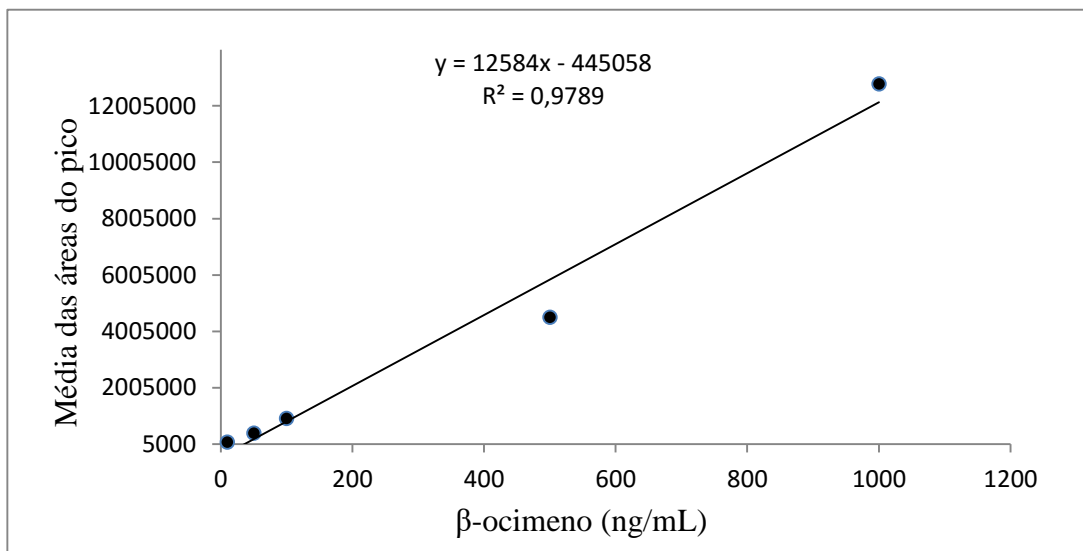
COMPOSTOS	Equador 72		BRS Jari	
	Controle	Infestada	Controle	Infestada
4-metil-octano	X	X	-	X
3,7 dimetil-decano	-	X	X	-
Tridecano	X	-	-	-
5-butil-nonano	X	-	-	-
3,8 dimetil-undecano	-	X	-	-
4-metil-undecano	X	-	-	X
3-metil-5-propilnonano	-	X	-	-
4-metiltridecano	-	X	-	X
Ciclododecano	X	X	X	X
4,6 dimetil-dodecano	X	X	-	-
2,4,6,1-tetrametilhexadecano	-	-	X	-
Heptadecano	-	-	X	-
Octadecano	-	-	X	-
Heneicosano	-	-	X	-
Hexadecano	X	-	X	-
Pentadecano	X	-	X	-
5-metil-undecano	-	-	X	-
2,6 dimetil-decano	-	-	X	X
5-etil-2-metil-octano	X	-	X	X
1-hexadeceno	X	-	X	-
1-nonadeceno	X	-	X	X
Ciclotetradeceno	X	-	-	-
1-dodeceno	X	-	-	X
1-tetradeceno	X	-	-	-
2-dodeceno	-	-	-	X
3-tetradeceno	-	-	-	X
3-heptadeceno	-	-	X	-
1-octadecanol	-	X	-	-
2-butil-1-octanol	-	X	-	-
2,4 ditert-butilfenol	X	X	-	X
1-dodecanol	-	-	-	X
n-decanal	-	X	-	X
4-octen-3-ona	X	X	-	X
3-etilacetofenona	X	-	-	-
Beta-cariofileno	X	X	X	X
Humuleno	-	X	-	-
Linalol	X	X	X	X
cis-beta-ocimeno	X	X	-	-
trans-beta-ocimeno	X	X	X	X
Longifoleno	-	X	-	-
Farnesol	X	X	-	X
Metil-salicilato	X	-	X	-
1,6-dimetildecahidronaftaleno	X	X	-	-
2,3-benzopirrole	-	X	-	-
3,3 dimetil-piperidina	X	-	-	-

(X) presente, (-) ausente

As plantas controle do cultivar Equador 72 apresentaram um maior número de compostos quando comparado com os outros tratamentos. Além de apresentar o farnesol e cis-beta-ocimeno que são encontrados tanto em plantas controle quanto nas plantas infestadas. Além desses compostos exclusivos das plantas controle do cultivar Equador 72, quando essas plantas foram submetidas à infestação pelo percevejo-de-renda (*V. illudens*) elas apresentaram além desses compostos outro composto presente apenas nessa variedade o humuleno, que é um isômero do trans-beta-cariofileno.

As plantas das duas cultivares, tanto controle quanto nas infestadas, emitiram entre seus COVs, o monoterpeneo trans-beta-ocimeno. A emissão desse composto foi quantificada usando uma curva de calibração, como mostrado no gráfico 2.

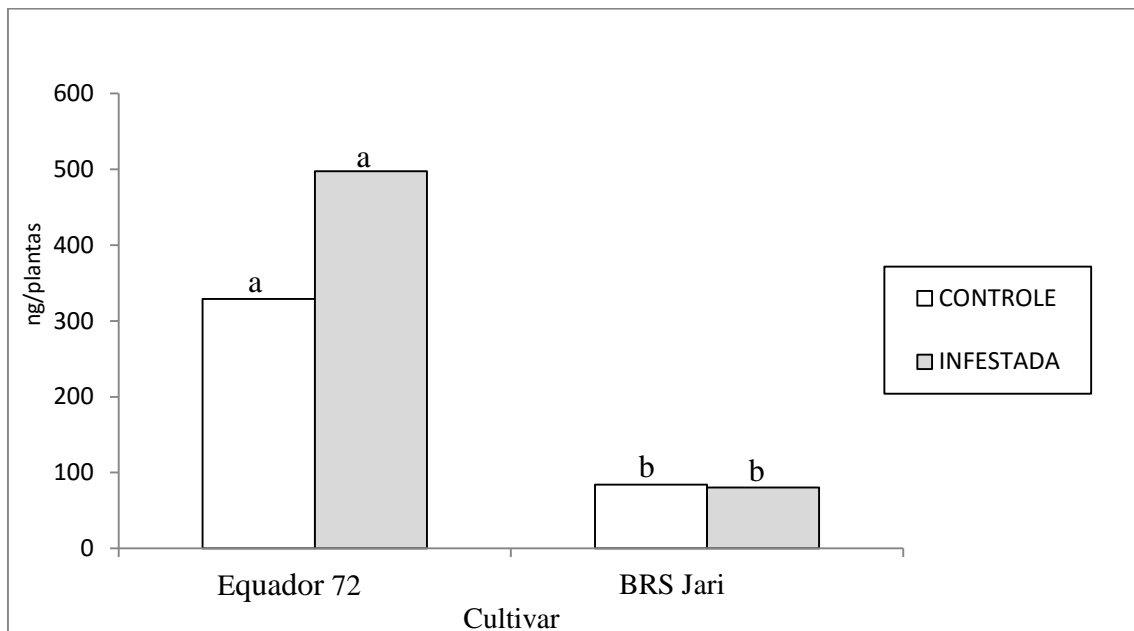
**Gráfico 2** Curva de quantificação do padrão  $\beta$ -ocimeno



A cultivar Equador 72, nos dois tratamentos, apresentou uma emissão muito mais elevada quando comparada com os dois tratamentos da cultivar BRS Jari (Gráfico 3), mostrando uma diferença significativa entre as duas cultivares, tanto nas plantas controle quanto nas plantas infestadas. As emissões foram de 329 ng/planta em média nas plantas controle e 497 ng/planta nas plantas infestadas da cultivar Equador 72. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas nas emissões quando as plantas controle e infestadas foram comparadas dentro da mesma cultivar.



**Gráfico 3** Emissão de trans-beta-ocimeno por plantas controle e infestada dos dois cultivares (Tukey  $p < 0,05$ ).



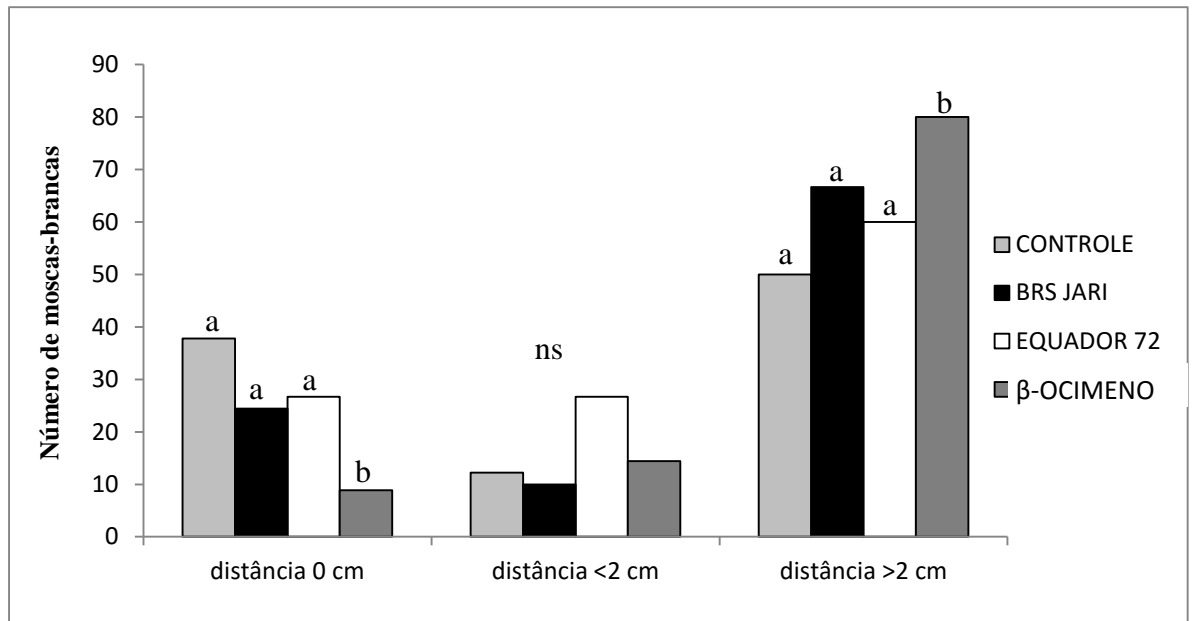
a- não mostrou diferença significativa entre os dois tratamentos, mais entre as duas cultivares.

b- não mostrou diferença significativa entre os dois tratamentos.

#### 4.1.2 Bioensaio de repelência usando os COVs dos dois cultivares.

Ao analisar os resultados dos bioensaios de repelência, verificou-se que não houve diferença significativa no comportamento das moscas-brancas frente ao controle com hexano e os extratos das duas cultivares. Quando avaliado o comportamento frente ao padrão de  $\beta$ -ocimeno, as moscas-brancas evitaram este composto, exibindo comportamento de repelência (gráfico 4).

**Gráfico 4** Bioensaio de repelência da mosca-branca frente aos extratos de voláteis das cultivares BRS Jari, Equador 72 e padrão de  $\beta$ -Ocimeno (Scott-Knott  $p < 0,05$ )



A distância 0 cm (repousando sobre a tela anti-afídica), distância < 2 cm (repousando sobre as paredes do cilindro a partir da tela até 2 cm) e distância > 2 cm (do repouso sobre as paredes do cilindro a partir de 2 cm ao fundo do cilindro). Letras diferentes apresentaram médias estatisticamente diferentes para uma mesma distância.

#### 4.2 Identificação dos compostos epicuticulares das lagartas da broca gigante

A análise dos compostos epicuticulares das lagartas da broca gigante mostrou poucos compostos e quase todos da mesma classe, sendo ésteres de cadeia longa os mais predominantes seguidos de ácidos carboxílicos, além de um álcool e um terpeno. Os compostos presentes nos extratos das larvas da broca gigante e os seus índices de retenção estão listados na tabela 2.

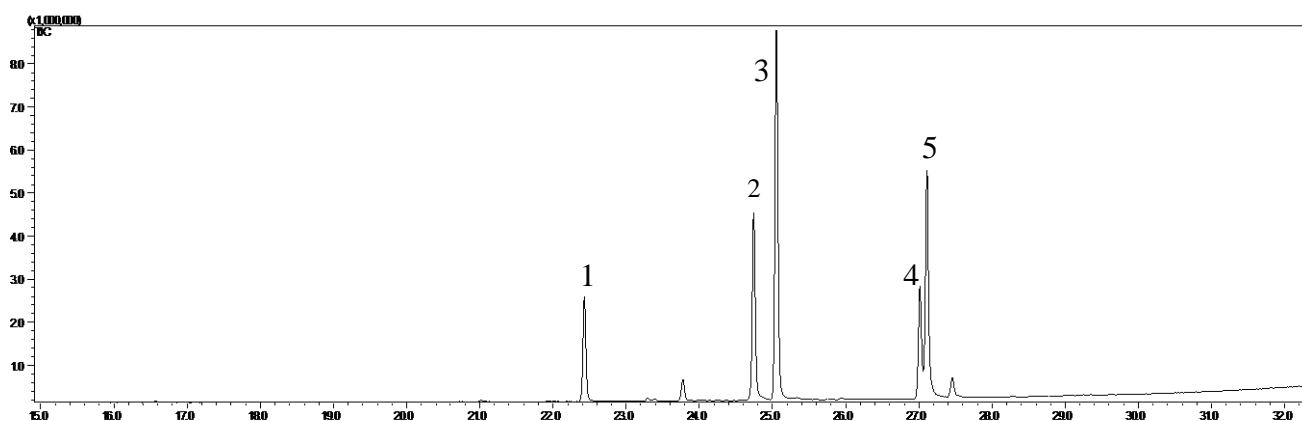
**Tabela 2** Compostos encontrados nas epicutículas das lagartas da broca gigante da Cana-de-açúcar.

Pico	KI <sup>a</sup>	Compostos
1	1408	$\beta$ -cariofileno
2	1692	Acetato de tridecila
3	1792	Acetato de tetradecila
4	1863	Acetato de pentadecila
5	1939	Acido hexadecanoico
6	1968	Acetato de (Z)-11-hexadecen-1-ila
7	1991	Acetato de hexadecila
8	2015	Bis-(2-etilhexil) metil-fosfonato
9	2155	(E)-9-hexadecenol
10	2163	Acetato de (Z)-7-octadecen-1-ila
11	2192	Acetato de octadecila
12	2363	Ácido octadecanoico
13	2503	Linoleato de metila

KI<sup>a</sup>-Índice de retenção de Kovats calculado

Entre os compostos encontrados nas epicutículas das lagartas da broca gigante, os que apresentaram uma menor intensidade foram o beta-cariofileno e os ácidos carboxílicos. Entretanto os compostos que apresentaram uma maior intensidade quando levadas em comparação as médias das áreas dos picos foram acetato de tetradecila, acetato de-(Z)-11-hexadecen-1-ila, acetato de hexadecila, (E)-9-hexadecenol e acetato de (Z)-7-octadecen-1-ila. A figura 16 apresenta o perfil cromatográfico destes compostos.

**Figura 16** Cromatograma dos compostos epicuticulares das lagartas da broca gigante extraídos com hexano.

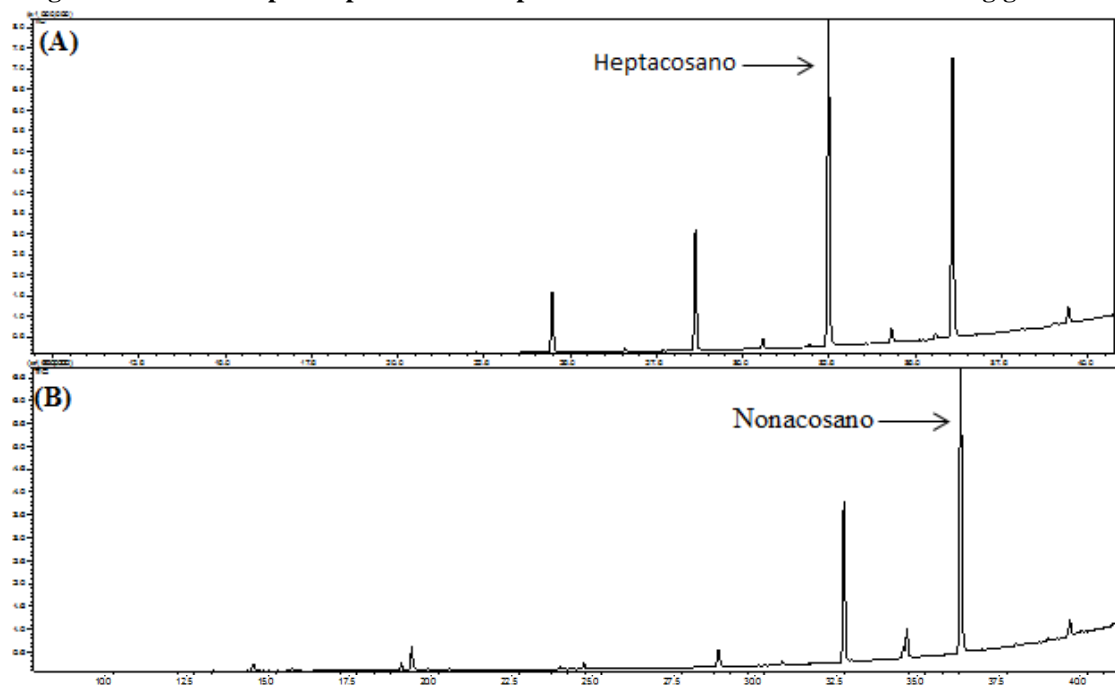


Compostos encontrados nas epicutículas das lagartas da broca gigante. **1**- acetato de tetradecila; **2**- acetato de-(Z)-11-hexadecen-1-ila; **3**- acetato de hexadecila; **4**- (E)-9-hexadecenol; **5**- acetato de (Z)-7-octadecen-1-ila. (somente são mostrados os picos com maiores intensidades).

### 4.3 Identificação dos compostos epicuticulares dos Adultos da broca gigante

Os compostos encontrados nas epicutículas de machos e fêmeas da broca gigante foram muito similares, com a exceção de três compostos que estão presentes exclusivamente na epicutícula do macho, quais sejam: ácido n-hexadecanoico, 1-hexadecanol e o tetracosano (C-24). Os demais compostos são n-alcenos que variam de C-23 a C-30. Os compostos diferem apenas em suas quantidades em cada sexo, como apresentado na figura 17.

**Figura 17** Compostos presentes nas epicutículas de machos e fêmeas da broca gigante.



(A) Cromatograma dos compostos epicuticulares da fêmea da broca gigante; (B) Cromatograma dos compostos epicuticulares do macho da broca gigante. CG/MS dos compostos em coluna Nist-01.

Os machos da broca gigante apresentam uma maior quantidade de compostos cuticulares em comparação com os compostos encontrados nas fêmeas. A tabela 3 mostra os compostos encontrados nas cutículas de machos e fêmeas de adultos da broca gigante da cana-de-açúcar.

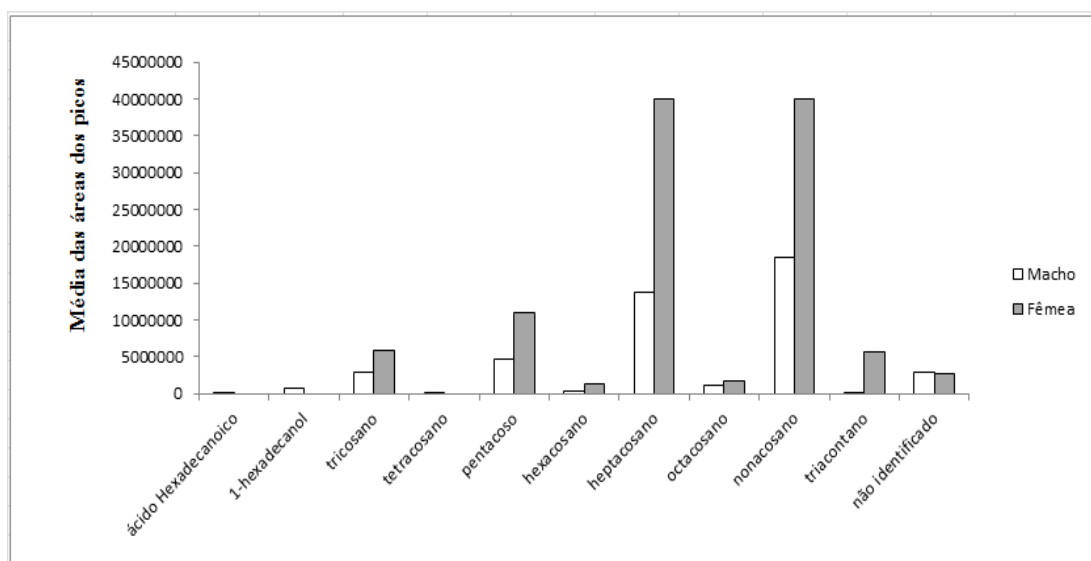
**Tabela 3** Compostos presentes na epicutícula de machos e fêmeas da broca gigante.

Compostos cuticulares	Machos	Fêmeas	KI <sup>a</sup>	KI <sup>b</sup>
Ácido n-Hexadecanoico	X		1938	1950
1-Hexadecanol	X		2063	-
Tricosano	X	X	2299	2300
Tetracosano	X		2400	2400
Pentacosano	X	X	2499	2500
Hexacosano	X	X	2599	2600
Heptacosano	X	X	2699	2700
Octacosano	X	X	2800	2800
Nonacosano	X	X	2899	2900
Triacotano	X	X	3000	3000
Não identificado	X	X	2996	

a- Índice de retenção Kovats calculado; b- Índice de Kovats encontrado no pherobase; - KI não foi encontrado para a coluna usada.

Apesar de pouca diferença entre os compostos epicuticulares presentes em machos e fêmeas, eles se diferenciaram em sua intensidade. Os compostos presentes na epicutícula do macho tem menor intensidade quando comparados com os das fêmeas. O gráfico 5 apresenta essa diferença na intensidade dos compostos presentes em machos e fêmeas.

**Gráfico 5** Intensidade dos compostos presentes nas cutículas de machos e fêmeas da broca gigante.



#### 4.4 Atividade antimicrobiana dos compostos epicuticulares.

Os testes antimicrobianos realizados com os compostos epicuticulares das lagartas da broca gigante apresentaram resultados positivos em duas das quatro concentrações que foram utilizadas.

Os resultados apresentados para o isolados “G” (não identificado) mostraram que os epicuticulares das lagartas mostraram atividade inibitória apenas para concentração de 10 mg/mL. Já para o isolado “X” (*Pectobacterium corotovorum*) os compostos não apresentaram nenhum tipo de atividade nas quatro concentrações usadas. No isolado “C” (*Bacillus pumilus*), os extratos não apresentaram nenhuma atividade nas quatro concentrações. Entretanto para o isolado “O” (*Bacillus cereus*), os compostos apresentaram uma atividade inibitória na concentração de 5 e 10 mg/mL, Como apresentados na tabela 4.

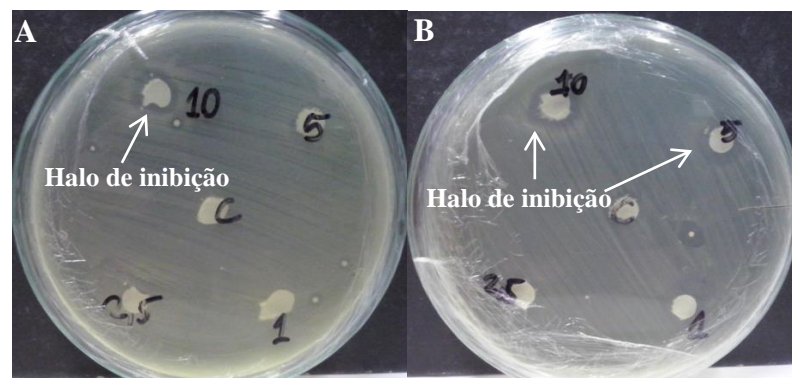
**Tabela 4** Atividades inibitória dos extratos epicuticulares das lagartas broca gigante frente alguns endofíticos isolados de cana-de-açúcar.

ISOLADOS	Concentrações dos Extratos (mg/mL)			
	1,0	2,5	5,0	10,0
<i>Bacillus cereus</i> (O)	-	-	+	+
<i>Bacillus pumilus</i> (C)	-	-	-	-
Não identificado (G)	-	-	-	+
<i>Pectobacterium corotovorum</i> (X)	-	-	-	-

(-) Não apresentou atividade de inibição frente ao isolados, (+) Mostrou atividade inibição frente ao isolados.

As figura 18 mostra os halos de inibição apresentados pelos epicuticulares das lagartas da broca gigante frente aos endofíticos isolados *Bacillus cereus* (O), e não-identificado (G).

**Figura 18** Atividade antimicrobiana com os compostos epicuticulares de broca gigante sobre os isolados endofíticos da cana-de-açúcar (G e O).



Os números se referem às concentrações (1; 2,5;5;10 mg/mL), A - isolado “G” (não-identificado), B - isolado “O” (*Bacillus cereus*) e C nas duas placas refere-se ao controle (Foto: Thyago Ribeiro, 2015).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 COVs emitidos pelas duas cultivares de mandioca

As plantas são grandes trocadoras de gases, não somente de forma literal, na qual grandes florestas são construídas a partir de gases provenientes do ar, mas também devido à liberação de bouquets de COVs volta para o ar. Essa grande habilidade alimenta a expectativa de que as plantas se comunicam através de sinais voláteis (BALDWIN, 2002). O papel ecológico dos voláteis pode variar entre as diferentes espécies de plantas. Portanto, os COVs podem ter uma atividade repelente e atuar como uma defesa direta dificultando os processos de oviposição e dano por artrópodes fitófagos; podem atrair inimigos naturais, principalmente quando há o ataque e consequente dano ao tecido vegetal; e também podem sinalizar e alterar fisiologicamente plantas adjacentes para se defenderem ou prepararem o seu sistema de alerta, conhecido como efeito "priming". Por outro lado, os herbívoros podem também utilizar estes sinais como pistas para localizar sua fonte alimentar, portanto apresentando assim um custo ecológico.

O blend de voláteis liberado pode ser bastante variável e ser específico para uma determinada interação planta-herbívoro, estágio de desenvolvimento, idade da folha, tecido da planta, espécie de planta (DICKE & VAN LOON, 2000) e inclusive entre diferentes variedades dentro da mesma espécie (COSTA et al., 2011).

Compostos orgânicos voláteis e seu papel ecológico ainda não foram descritos para a espécie *M. esculenta*. Quando analisamos os COVs de duas cultivares (BRS Jari e Equador 72), elas apresentaram alguns compostos em comum, no entanto a cultivar Equador 72 apresentou um maior número de compostos liberados, todos em maior concentração e muitos compostos exclusivos, quando comparados com a cultivar BRS Jari. A cultivar Equador 72 é um genótipo pertencente ao banco de germoplasma do CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) que tem sido avaliado e considerado resistente a uma série de pragas. Alguns estudos mostram que a mosca-branca (*Aleurotrachellus socialis*) se alimentando nesse cultivar apresentou menor oviposição, período de desenvolvimento mais longo, tamanho reduzido e maior mortalidade quando comparada a genótipos suscetíveis (ARIAS, 1995). Além disso, a cultivar mostrou-se resistente ao percevejo-de-renda em campo (Dr. Éder Jorge de Oliveira - comunicação pessoal). A cultivar BRS Jari é uma cultivar desenvolvida pela Embrapa que apresenta altos teores de  $\beta$ -caroteno, no entanto, apresenta suscetibilidade a pragas. Há vários relatos de que variedades diferentes apresentaram misturas diferentes de COVs, como o milho (SHEEN et al., 2002) e o

pimentão (COSTA et al., 2011), sendo que neste a emissão do composto 6-metil-5-hepten-2-ona é um dos responsáveis pela não preferência da cultivar resistente. As variedades de mandioca mostraram comportamento semelhante (DUDAREVA, 2006; PARÉ et al., 1999).

Ambas cultivares, no tratamento controle, apresentaram metabólitos secundários que geralmente são liberados por plantas que estão sendo atacadas por herbívoros, conhecidos como voláteis induzidos por ataque de herbívoro (HIPVs), tais como trans-beta-cariofileno, linalol e trans-beta-ocimeno. Estes compostos são sintetizados pela via dos terpenoides, sendo muito importantes para plantas nas suas estratégias de defesas contra herbívoros. Compostos como o  $\beta$ -ocimeno e homoterpenos como (*E, E*)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno (TMTT) e o sesquiterpeno (*E, E*)- $\alpha$ -farneseno, foram emitidos após algumas horas de infestação pelo coleóptero *Leptinotarsa decemlineata* em plantas de tomate. Esses HIPVs têm sido descritos defendendo as plantas diretamente, repelindo, impedindo a oviposição e causando toxicidade para o herbívoro, ou indiretamente, atraindo os inimigos naturais e ajudando as plantas não sofrerem maiores danos (WAR et al., 2012).

Embora as duas cultivares emitam alguns HIPVs, a variedade Equador 72 apresentou altos níveis de emissão do trans- $\beta$ -ocimeno nas plantas controle e infestadas. Além deste composto esta, cultivar emitiu também farnesol e cis- $\beta$ -ocimeno.

O trans- $\beta$ -ocimeno é um monoterpene que foi liberado por plantas de feijão fava, (*Phaseolus lunatus*) infestadas com ácaros (*Tetranychus urticae*). A liberação de trans- $\beta$ -ocimeno atraiu um inimigo natural predadores de ácaros. Além disso, este composto tem sido descrito como um possível sinal na interação planta-planta, uma vez que estimulou as via de sinalização do ácido jasmônico e do etileno em plantas de feijão fava sadias expostas ao ocimeno (SHIMODA et al., 2012; ARIMURA et al., 2004). Plantas de tomate, quando cultivadas juntamente com plantas de tabaco superexpressando  $\beta$ -ocimeno, também mostraram uma indução na defesa direta e indireta contra afídeos, reforçando o papel deste composto como candidato para uso em uma estratégia de controle sustentável de pragas agrícolas (CASCONI et al., 2015).

As plantas do cultivar BRS JARI que foram infestadas com o percevejo-de-renda não apresentaram aumento na emissão do trans- $\beta$ -ocimeno, enquanto as plantas infestadas da cultivar Equador 72 mantiveram as emissões praticamente constantes em comparação com quantidades emitidas pelas plantas sadias. Porém, as plantas que sofreram a infestação mostraram além dos compostos já citados anteriormente, a presença de um terpeno adicional,



o humuleno, que é um isômero do cariofileno, que também foi descrito como composto de defesa emitido por plantas de milho, quando atacadas por herbívoros (ROBERT et al., 2012).

A quantidade de trans- $\beta$ -ocimeno emitida por plantas controle e infestadas pela cultivar Equador 72 não apresentou diferença significativa. Isso ocorre provavelmente por que tanto as plantas controle quanto as plantas infestadas desta cultivar mantem as suas rotas biosintéticas de defesas ativadas principalmente a rota dos terpenóides, resultando assim em emissões tão elevadas em ambos tratamentos. Possivelmente a grande presença de HIPVs nas plantas controle da variedade Equador 72, aliada com essa elevada emissão de trans- $\beta$ -ocimeno, seja a chave para sua resistência frente a algumas pragas no campo.

## 5.2 Bioensaios de repelência dos COVs das duas variedades frente a mosca-branca

Ao analisar os resultados do bioensaio de repelência dos extratos das cultivares suscetível e resistente, verificou-se que não houve diferença significativa entre o controle com hexano e os extratos das duas cultivares. Quando testado o padrão de  $\beta$ -ocimeno, as moscas-brancas demonstraram um comportamento de repelência a este composto. A cultivar Equador 72 é descrita como resistente à mosca-branca *A. socialis*. Arias (1995), ao descrever esta resistência, mostra que há uma série de alterações no desenvolvimento da mosca-branca testada, entre elas a redução da oviposição e o retardamento do desenvolvimento. No entanto, o inseto consegue se desenvolver na planta não evidenciando haver uma atividade de repelência. Além disso, utilizamos um ensaio sem chance de escolha, o que pode não revelar realmente a atividade biológica e a relevância ecológica dos compostos que estão em maiores concentrações e outros que são produzidos exclusivamente pela cultivar resistente.

Há a necessidade de bioensaios adicionais com chance de escolha, tipo olfatômetro em Y ou de quatro braços, comparando os extratos voláteis das duas cultivares frente à atração ou repelência da mosca-branca e o percevejo-de-renda. Um levantamento detalhado sobre as populações de pragas e inimigos naturais em campo, bem como e a influência desses compostos sobre o ciclo de vida e desenvolvimento desses insetos também pode auxiliar a desvendar a atividade biológica e o significado ecológico dos COVs da cultivar Equador 72, já que o composto  $\beta$ -ocimeno é produzido em grandes quantidades por essa cultivar e, nos bioensaios, mostrou repelir a mosca-branca testada. O estudo da interação planta-planta é outro mecanismo que deve ser levado em consideração em estudos futuros.

### 5.3 Compostos epicuticulares das lagartas da Broca gigante

Os compostos encontrados nas lagartas da broca gigante apresentaram-se em sua grande maioria como ésteres de cadeia longa, ácidos carboxílicos, álcoois e o terpeno beta-cariofileno. Os compostos cuticulares de outras espécies de insetos podem conter componentes das seguintes classes: hidrocarbonetos, ácidos graxos, álcoois, cera de ésteres e triacilgliceróis, podendo também apresentar em algumas espécies aldeídos, cetonas, ésteres e esteróis. A composição da cutícula em insetos pode variar dependendo do estágio de desenvolvimento, sexo, idade, e posição hierárquica dentro da colônia. Essas ceras cuticulares também podem variar dentro de cada espécie em resposta às condições ambientais, tais como a temperatura, umidade e fontes de alimento disponíveis. A principal função da epicutícula é a proteção dos insetos contra a dessecação, no entanto, têm papel preponderante em evitar infecções microbianas, afetam a adsorção de produtos químicos, como os inseticidas, desempenham um papel importante na comunicação química dos insetos e também são aplicados na quimiotaxonomia de insetos (GOŁĘBIEWSKI et al., 2011).

Nas lagartas de *T. licus*, os ésteres de cadeia longa estão em número bem maior do que os outros compostos, e se apresentam em maior concentração. Portanto, são os principais compostos presentes nas epicutículas dessas lagartas. Em termos de porcentagem (considerando a média das áreas dos picos) os ésteres totalizaram 98,44% dos compostos presentes nas epicutículas das lagartas da broca gigante.

Ésteres de cadeia longa têm sido descritos para alguns insetos e as porcentagens variam nos diferentes instares e de espécie para espécie. Foram descritos nas cutículas das larvas de *Attagenus megatoma* (Coleoptera: Dermestidae) e em adultos de *Bemisia tabaci*, apresentando um número par de carbonos variando em número de carbonos de C<sub>38</sub> a C<sub>64</sub>. Eles também foram encontrados em larvas de *Pogonomyrmex barbatus*, *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini*, e larvas *Galleria mellonella*, adultos de *Acanthoscelides obtectus* e adultos e em ninfas de *Zygotomma exclamationis* (BAKER et al., 1979; GOŁĘBIEWSKI et al., 2011).

A análise dos compostos da broca gigante revelou a presença do sesquiterpeno beta-cariofileno. A origem deste terpeno entre os compostos epicuticulares das larvas pode ser a planta hospedeira, já que os insetos utilizados são provenientes do campo. Quando o inseto ataca a planta, há a liberação de compostos de defesa, entre eles os terpenóides. Particularmente, a cana-de-açúcar quando atacada por *D. saccharalis*, tanto no colmo quanto nas folhas, libera altas concentrações de β-cariofileno (RIFFEL et al., 2013). Estudos adicionais são necessários

para verificar se plantas de cana-de-açúcar produzem cariofileno também quando atacadas em suas raízes, especialmente pela broca gigante. Além disso, os terpenos estão entre os lipídios presentes nas ceras cuticulares de folhas de plantas, e têm sido muitas vezes relatados como semioquímicos, como por exemplo, o zingibereno. Zingibereno é um sesquiterpeno de ocorrência em espécies selvagens de tomate (*Lycopersicon hirsutum*). Em folhas de diferentes variedades de batata (*Solanum tuberosum*) também encontram-se vários sesquiterpenos, entre eles  $\beta$ -cariofileno, trans- $\beta$ -farneseno, germacreno D,  $\beta$ -sesquifelandreno e germacreno D-4-ol (SZAFRANEK et al., 1997). Possivelmente, quando as lagartas dos insetos atacam e fazem seus túneis ou galerias nas plantas, esses compostos ficam impregnados em sua superfície.

Os ácidos hexadecanóico (ácido palmítico) e ácido octadecanóico (ácido esteárico) encontrados na epicutícula da broca gigante, também foram descritos nas cutículas de lagartas de dois outros lepidópteros *D. pini* e *G. mellonella* (GOŁĘBIEWSKI et al., 2008). A principal função dos compostos cuticulares de insetos é a proteção do inseto contra perda de água, estando também envolvidos em vários tipos de comunicação química entre espécies. Além disso, reduzem a penetração de inseticidas e toxinas, bem como fornecem proteção contra o ataque de microrganismos, insetos parasitas e predadores (GOŁĘBIEWSKI et al., 2011).

Essa mistura de compostos que formam as cutículas dos insetos são muito importantes principalmente para insetos associados ao solo, como é o caso das lagartas da broca gigante. Estes insetos estão constantemente em contato com uma ampla gama de microrganismos, logo precisam de uma barreira de proteção muito eficiente. Além do solo, quando estes entram em contato com a planta, são desafiados novamente por uma grande quantidade de microrganismos endofíticos. Os extratos dos compostos epicuticulares de broca gigante mostraram atividade contra os isolados de *Bacillus cereus* e outro endofítico não-identificado, reforçando a importância destes compostos para o inseto.

Compostos cuticulares de abelhas pertencentes a diferentes espécies (*Amegilla bombiformis*, *Amegilla asserta*, *Exoneura nigrescens*, *Exoneura robusta*, *Exoneurella tridentata* e *Trigona carbonaria*) apresentaram atividade inibitória frente a *Staphylococcus aureus*. Compostos cuticulares encontrados em duas espécies de aranhas (*Santola* e *Ergandros diaea*), também mostraram atividade antifúngica frente ao fungo *Beauveria bassiana* (STOW et al., 2007; GONZALEZ-TOKMAN et al., 2014).

A broca gigante é uma praga associada ao solo que ainda não tem um controle eficiente, pois devido à localização da lagarta no solo e dentro da própria planta, o acesso de qualquer substância à lagarta fica dificultado. Apesar disso, há a aplicação de inseticidas e

consequentemente sua presença no solo. No entanto, não há relatos de mortalidade desta broca pelo inseticida. É possível especular que a mistura de compostos encontrada nas cutículas das lagartas da broca gigante podem estar auxiliando na resistência ao uso de inseticidas que são jogados no campo e se acumulam no solo.

Os compostos epicuticulares encontrados nos adultos da broca gigante foram praticamente n-alcenos com esqueletos de carbono de C-23 a C-30. São compostos descritos com muita frequência como componente de cutículas de muitas espécies de insetos. Existem milhares de compostos cuticulares descritos, entretanto, entre as principais classes encontradas em insetos estão os alcanos (BLOMQUIST, 2011).

Os n-alcenos em cutículas geralmente variam em comprimento de cadeia de 21 a 33 carbonos. Hidrocarbonetos com menos de 20 átomos de carbono geralmente ocorrem como feromônios e compostos defensivos intermediários a feromônios, pois sua volatilidade torna-os inadequados para comporem a cutícula. Os n-alcenos foram encontrados em quase todas as espécies de insetos já caracterizados, e podem variar de menos de um por cento dos hidrocarbonetos, como verificado em adultos da mosca tsé-tsé, ou comporem para quase a totalidade da fração de hidrocarboneto, como ocorre no besouro adulto de *Tenebrio*, (*Eurychora* sp.) (BLOMQUIST, 2011).

Quando analisadas as diferenças entre os sexos de adultos de *T. licus*, tanto os compostos epicuticulares dos machos quanto os das fêmeas apresentaram praticamente a mesma composição de n-alcenos. Além disso, os machos apresentaram exclusivamente em sua constituição cuticular o tetracosano (C-24), ácido n-Hexadecanóico e o 1-hexadecanol. Alguns desses alcanos também foram encontrados em *D. saccharalis*, que apresenta em seus compostos cuticulares alguns n-alcenos que vão de (C-23 a C-34). Estes compostos foram também identificados em outro inseto, *Lasioderma serricorne* porém, com esqueletos de carbono de C-25 a C-27 e C-32 a C-33 (GIROTTI et al., 2012; BAKER et al., 1979). Apesar de os machos apresentarem um maior número de compostos epicuticulares em relação às fêmeas, os compostos da fêmea apresentaram-se sempre com maiores intensidades para a maioria dos seus n-alcenos.

O ácido 1-hexadecanóico foi o único composto comum às fases larval e adulto. O ácido hexadecanóico (ácido palmítico) foi descrito nas epicutículas de *D. pini* e *G. mellonella* (GOŁĘBIEWSKI et al., 2008), porém apenas no estágio larval. Sendo assim, este foi o único composto que permaneceu após as mudanças de fase de lagarta para adulto na broca-gigante.

O composto 1-hexadecanol foi descrito em glândulas de formigas onde elas armazenam seu veneno, agindo como barreira protetora e evitando a corrosão desse tecido e dessa forma protegendo as formigas (LOPES et al., 2015).

A atividade biológica e a relevância comportamental e ecológica para compostos epicuticulares de adultos é bastante descrita. Além da proteção contra a dessecação, eles desempenham um papel importante na comunicação química dos insetos, atuando como semioquímicos (GOŁĘBIOWSKI et al., 2011), especialmente para comunicação em curtas distâncias. Em broca gigante, não há ainda feromônio descrito, apesar de vários grupos trabalharem intensamente tentando a identificação. Nós encontramos como constituintes da epicutícula, compostos exclusivos e concentrações bastante distintas entre machos e fêmeas de broca gigante. Estes compostos e as diferenças nas concentrações podem influenciar na comunicação a curta distância, inclusive para estimular o comportamento sexual. No entanto, estas afirmações são apenas hipóteses e experimentos adicionais estão sendo desenvolvidos para testá-las.

## 6 CONCLUSÕES

- As cultivares BRS Jari e Equador 72 apresentam diferenças tanto quali quanto quantitativas nos COVs emitidos.
- A cultivar Equador 72 apresentou entre seus COVs uma quantidade considerável de terpenos que relatadamente atuam na defesa de plantas contra ataque de herbívoros, tais como o beta-ocimeno, beta-cariofileno, farnesol e linalol.
- As plantas da cultivar Equador 72 emitiram quantidades significativamente mais elevadas de beta-ocimeno tanto nas plantas controle, quanto nas infestadas pelo percevejo-de-renda *V. illudens*.
- Os extratos das duas cultivares e o padrão  $\beta$ -ocimeno testados nos bioensaios de repelência contra a mosca-branca, apenas o padrão sintético  $\beta$ -ocimeno mostrou atividade repelente.
- Os compostos epicuticulares das lagartas da broca gigante (*T. licus*) foram identificados, apresentando-se uma grande quantidade de ésteres de cadeia longa totalizando 98,44% da composição da sua epicutícula.
- Os compostos epicuticulares de lagartas de broca gigante mostraram atividade inibitória sob o crescimento dos isolados endofíticos “G” (não-identificado) e o isolado “O” (*Bacillus cereus*).
- Há uma grande presença de n-alcenos nas epicutículas de machos e de fêmeas de broca gigante.
- Os extratos de machos apresentaram um maior número de compostos, além de apresentar compostos exclusivos, como ácido hexadecanóico, tetracosano e 1-hexadecanol.
- Os compostos epicuticulares das fêmeas foram mais intensos que os dos machos.

## 7 REFERÊNCIAS

- ARIAS, B. Estudio sobre el comportamiento de la “mosca blanca” *Aleuro trachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) en diferentes genotipos de yuca, *Manihot esculenta* Crantz. **Manihot esculenta**, 1995.
- ARIMURA, G. et al. Herbivore-induced defense response in a model legume. Two-spotted spidermites induce emission of (E)- $\beta$ -ocimene and transcript accumulation of (E)- $\beta$ -ocimene synthase in *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, v. 135, n. 4, p. 1976-1983, 2004.
- BAKER, J. E. et al. Cuticular lipids of larvae and adults of the cigarette beetle, *Lasioderma serricornis*. **Insect Biochemistry**, v. 9, n. 6, p. 603-611, 1979.
- BALDWIN, I. T. et al. Volatile signaling in plant-plant-herbivore interactions: what is real? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 4, p. 351-354, 2002.
- BALDWIN, I. T. Plant volatiles. **Current Biology**, v. 20, n. 9, p.392-397, 2010.
- BENEDINI, M. S.; CONDE, A. J. Broca gigante: nova praga da cana de açúcar na região sul. **Revista Coplana**, Guariba, p.24-25, set. 2008.
- BLOMQUIST, G. J. **Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical ecology**. Cambridge University Press, 2010.
- BOTELHO et al. Outras larvas que atacam cana de açúcar. In pinto, A. S. (org.) controle de pragas da cana de açúcar, **Sertãozinho Biocontrol**, (Boletim Técnico Biocontrol, 1) p. 25-28, 2006.
- CASCONE, P. et al. Tobacco over expressing  $\beta$ -ocimene induces direct and indirect responses against aphids in receiver tomato plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 173, p. 28-32, 2015.
- CONAB. **Acompanhamento de Safra Brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento**. Companhia Nacional do Abastecimento. BRASÍLIA: 32 p. 2014. Disponível em <[http://www.conab.gov.br/conteúdos.php?a=1253&&Pagina\\_objemsconteudos=1#A\\_objemsconteudos](http://www.conab.gov.br/conteúdos.php?a=1253&&Pagina_objemsconteudos=1#A_objemsconteudos)>. Acesso em: 01 de Jun. 2015.
- CONAB. **Acompanhamento de Safra Brasileira: cana-de-açúcar, primeiro levantamento**. Companhia Nacional do Abastecimento. BRASÍLIA: 19 p. 2015. Disponível em <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_04\\_13\\_08\\_49\\_33\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_1o\\_lev\\_-\\_15-16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_13_08_49_33_boletim_cana_portugues_-_1o_lev_-_15-16.pdf)>. Acesso em: 21 de Jun. 2015.
- CTC. **Pragas e Doenças de cana-de-açúcar “Roguing”**. Centro de Tecnologia Canavieira: 55P.2013. Disponível em <<http://www.ctccanavieira.com.br>>. Acesso em: 30 Maio 2015.
- COSTA, J. G. et al. Differential preference of *Capsicum* spp. cultivars by *Aphis gossypii* is conferred by variation in volatile semiochemistry. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 299-307, 2011.

- DICKE, M.; LOON, J.J.A. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 97, n. 3, p. 237-249, 2000.
- DUDAREVA, N. et al. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytologist**, v. 198, n. 1, p. 16-32, 2013.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Metabolic engineering of plant volatiles. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 181-189, 2008.
- FAO. Save and Grow Cassava. A guide to sustainable production intensification. 2013. Disponível em < [http://www.fao.org/ag/save-and-grow/cassava/index\\_en.html](http://www.fao.org/ag/save-and-grow/cassava/index_en.html) > Acesso em: 02 de Jun. 2015.
- FERNANDO M. L. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. 2 ed. São Paulo: Ícone editora, 1991.
- FIALHO F., VIEIRA, E. A. **Mandioca no Cerrado: orientações técnicas**. Planaltina, DF : Embrapa Cerrados. 208 p. 2011.
- GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 2002. 920 p.
- GIROTTI, J.R. et al. Epicuticular hydrocarbons of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Physiological Entomology**, V. 37, N. 3, P 266-277, 2012.
- GOŁĘBIEWSKI, M. et al. Cuticular lipids of insects as potential biofungicides: methods of lipid composition analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 9, p. 3177-3191, 2011.
- GONZALEZ-TOKMAN, D. et al. Cuticular antifungals in spiders: density-and condition dependence. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. e91785, 2014.
- HASSAN, M. N. et al. Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. **Plant Biotechnology Journal**, 2015.
- HEUSKIN, S. et al. The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. **Biotechnology Agronomy Society Environment**, v. 15, n. 3, p. 459-470, 2011.
- HOWARD, R. W.; BAKER, J. E. Stage-specific surface chemicals of *Plodia interpunctella* : 2-acyl-1, 3-cyclohexanediones from larval mandibular glands serve as cuticular lipids. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 138, n. 2, p. 193-206, 2004.
- HOWARD, R. W.; BLOMQUIST, G. J. Chemical ecology and biochemistry of insect hydrocarbons. **Annual Review of Entomology**, v. 27, n. 1, p. 149-172, 1982.
- IBGE, **Produção Agrícola Municipal. Culturas Temporárias e Permanentes**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro, v. 37, p.1-91, 2010. Disponível em <



[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/PAM2010\\_Publicacao\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/PAM2010_Publicacao_completa.pdf)> Acesso em: 3 de Jun. 2015.

LESLIE, G. Pests of Sugarcane. In: JAMES, G. (ED). **Sugarcane**: Blackwell Publishing LTD, 2007. p.78-100.

MAFFEI, M. E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 612-631, 2010.

NAGEGOWDA, D. A. Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. **FEBS letters**, v. 584, n. 14, p. 2965-2973, 2010.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard**-Eight Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OTSUBO, A. A. et al. **Aspectos do Cultivo da Mandioca em Mato Grosso do Sul**. Embrapa Agropecuária Oeste. Dourados, MS, 2002. Disponível em <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/38819/1/LV20021.pdf>> Acesso em: 5 de Jun. 2015.

PARÉ, P. W. et al. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. **Plant Physiology**, v. 121, n. 2, p. 325-332, 1999.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 808-811, 2006.

PIETROWKI et al., **Insetos-praga da cultura da mandioca na região centro-sul do Brasil**. EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL. 2010. Disponível em <[http://www.unioeste.br/cursos/rondon/agronomia/docs/insetos\\_praga\\_da\\_cultura\\_da\\_mandioca.pdf](http://www.unioeste.br/cursos/rondon/agronomia/docs/insetos_praga_da_cultura_da_mandioca.pdf)> Acesso em: 10 de Jun. 2015.

PINTO, A. S. et al. Manejo das principais pragas da cana de açúcar. In SEGATO, S. V. et al (org.). **Atualização em produção da cana de açúcar**. Piracicaba, 257-280, 2006.

RIFFEL, A. et al. *Cotesia flavipes* is attracted to a sesquiterpene emitted by sugarcane in response to sugarcane borer infestation. In: International Chemical Ecology Conference, Melbourne, 2013.

ROBERT, C. A. M. et al. Herbivore-induced plant volatiles mediate host selection by a root herbivore. **New Phytologist**, v. 194, n. 4, p. 1061-1069, 2012.

SCHNEE, C. et al. The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)- $\beta$ -farnesene, (E)-nerolidol, and (E, E)-farnesol after herbivore damage. **Plant Physiology**, v. 130, n. 4, p. 2049-2060, 2002.

SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. DERAL - Departamento de Economia Rural. **Mandiocultura - Análise da Conjuntura Agropecuária**, 2013. Disponível

em<[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandiocultura\\_2013\\_14.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandiocultura_2013_14.pdf)> Acesso em: 8 de Jun. 2015.

SHIMODA, T. et al. The effect of genetically enriched (E)- $\beta$ -ocimene and the role of floral scent in the attraction of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* to spidermite-induced volatile blends of torenia. **New Phytologist**, v. 193, n. 4, p. 1009-1021, 2012.

SILVA JUNIOR, M. P. et al. Broca gigante da cana de açúcar, *Telchin licus licus* (DRURY, 1773) na região centro sul: preocupação para os produtores. **Revista Nucleus**, p 49-54,2008.

SONENSHINE, D. E. Pheromones and other semiochemic also fticks and their use in tick control. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S405-S425, 2004.

STOW, A. et al. Antimicrobial defences increase with sociality in bees. **Biology Letters**, v. 3, n. 4, p. 422-424, 2007.

SZAFRANEK, B. et al. Gas chromatographic analysis of plant and insect surface compounds: cuticular waxes and terpenoids. Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, **Toxicology and Some Specific Applications**, InTech, Rijeka, Croatia, p. 39-72, 2012.

TENÓRIO, R. Agricultura - do subsídio à política agrícola. **Revista IPEA**. n 8 . Ed. 68, 2011.

TRIANA, M. F. **Ecologia química da broca-peluda da cana-de-açúcar, *Hyponeuma taltula* Schaus, 1904 (Lepidoptera, Erebidae, Herminiinae)** 2015. (Mestrado em Química e Biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas, Maceió.

WAR, A. R. et al. Herbivore induced plant volatiles: their role in plant defense for pest management. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 12, p. 1973-1978, 2011.

WAR, A. R. et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores.. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 12, p. 1306–1320, 2012.

ZARBIN, P. H. G. et al. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova [online]**. v. 36, n. 9, p. 1395-1405, 2013.

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

ZHANG, W. et al. Repellency of ginger oil to *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 4, p. 1310-1318, 2004.