



RENORBIO
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

**Estudo do feromônio sexual de diferentes populações do
complexo *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830)
(Diptera:Tephritidae)**

Alana de Lima Mendonça

Maceió-AL
2014

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PONTO FOCAL: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

Estudo do feromônio sexual de diferentes populações do complexo *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera:Tephritidae)

Alana de Lima Mendonça

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia com sede na Universidade Federal Rural de Pernambuco e ponto focal na Universidade Federal de Alagoas, para obtenção do grau de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA.

Orientador (a):
Prof^a Dra. Ruth Rufino do Nascimento

Maceió-AL
2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Maria Auxiliadora G. da Cunha

M539e Mendonça, Alana de Lima.

Estudo do feromônio sexual de diferentes populações do complexo
Anastrepha fraterculus (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) / Alana
de Lima. – 2014.

104 f. : il. tabs., grafs. e mapas.

Orientadora: Ruth Rufino do Nascimento.

Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO.
Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 101-103.

1. Moscas-das-frutas. 2. Compatibilidade populacional. 3. Composição
química. I. Título.

CDU: 544.02:595.773.4

ALANA DE LIMA MENDONÇA

Estudo do feromônio sexual de diferentes populações do complexo *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera:Tephritidae)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia com sede na Universidade Federal Rural de Pernambuco e ponto focal na Universidade Federal de Alagoas, para obtenção do grau de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA.

APROVADA EM: 28/03/2014

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Ruth Rufino do Nascimento
(Orientador)

Prof. Dr. Antônio Euzebio Goulart Santana
(RENORBIO/ UFAL)

Dra. Beatriz Aguiar Jordao Paranhos
(EMBRAPA – SEMIÁRIDO)

Profª. Dra. Sônia Maria Forti Broglio
(CECA/UFAL)

Dr. João Gomes da Costa
(EMBRAPA – TABULEIROS COSTEIROS)

Dra. Lucie Vaníčková
(BJT- CNPQ)

A Deus,

Que iluminou e guiou meu caminho durante essa caminhada.

OFEREÇO

À Minha família,

Francisco Dias de Mendonça e Maria Sueli de Lima Mendonça (meus pais), Adriana de Lima Mendonça, José Rodrigo de Lima Mendonça e Raul Luis Dias de Goes (meus irmãos) e Julia Mendonça Goes (minha sobrinha), por terem me dado forças nos momentos mais difíceis, ajudado diretamente e indiretamente com suas experiências, por torcerem pelo meu sucesso e pelo incentivo para a obtenção deste título. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Rede Nordeste de Biotecnologia, que através do Curso de Doutorado em Biotecnologia (Área de concentração em Recursos Naturais), pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação;

À Universidade Federal de Alagoas, Instituição onde desenvolvi meu trabalho de tese;

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Ruth Rufino do Nascimento, pela orientação, grande incentivo, amizade, carinho e colaboração na minha vida acadêmica;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES -, pela concessão da bolsa de estudos;

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Ecologia Química pelo convívio e companheirismo;

À Amiga, Dr.^a Lucie Vaníčkova, pelo carinho, força e grande contribuição para a realização desse trabalho no que diz respeito as análises químicas;

Aos professores do Curso de Biotecnologia (RENORBIO) pelos ensinamentos transmitidos;

Ao Dr. Ales Tomcala e a Dr.^a Adriana de Lima Mendonça pela contribuição na análise estatística dos dados;

Ao Prof. Dr. Paulo Milet-Pinheiro (UFPE) pelas colaborações nas análises eletrofisiológicas e a Prof.^a Dr.^a Iara Sordi Joachim-Bravo (UFBA) pela disponibilização do seu laboratório e por ter cedido alguns espécimes analisados neste estudo;

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente, contribuíram com a realização deste trabalho e para meu crescimento como pessoa.

RESUMO

O complexo de espécies crípticas *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera:Tephritidae) é, hoje em dia, um dos modelos de insetos-praga mais estudados no que se refere à especiação e compatibilidade populacional. O aperfeiçoamento das técnicas empregadas no controle de insetos-praga é fundamental no sucesso da introdução de populações de laboratório entre as populações selvagens. Além disso, a comunicação mediada por feromônios desempenha uma importante função no processo de acasalamento destas moscas. Por sua vez, no comportamento de agregação de machos ocorre a emissão de voláteis que atraem fêmeas, entretanto, a composição exata ainda permanece desconhecida. Deste modo, o principal objetivo do presente estudo foi investigar a composição do feromônio de sete populações diferentes de *A. fraterculus*, oriundas de regiões brasileiras geograficamente distintas e da Argentina, como também, elucidar a composição química da mistura de voláteis emitida por machos de uma população do Estado de Alagoas, com o objetivo de identificar os compostos específicos, dentro desta mistura, os quais mediam a resposta comportamental em fêmeas coespecíficas. Para tanto, através da técnica de Cromatografia gasosa bidimensional acoplada a detector time-of-flight de espectrometria de massas (CGxCG/TOF-EM) e análises estatísticas multivariadas, bem como de análises por Cromatografia Gasosa acoplada a detector eletroantegráfico (CG-EAG), revelaram que a composição do feromônio de machos de *A. fraterculus* variou qualitativamente e quantitativamente entre as sete populações estudadas, além de identificar 29 compostos nas amostras de aeração de machos de *A. fraterculus* provenientes do Estado de Alagoas. Apesar disso, as análises por CG-EAG, com fêmeas desta população, demonstraram que somente seis compostos, a saber: α -pineno, limoneno, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol, (*E,E*)- α -farneseno e (*S,S*)-(-)-epianastrefina, eliciaram despolarização antenal em fêmeas desta espécie. A mistura sintética obtida a partir destes compostos eletrofisiologicamente ativos provocaram resposta comportamental em fêmeas de maneira similar àquela para extratos de aeração de machos coespecíficos, enquanto estes dois tratamentos obtiveram resposta maior do que para o controle hexano ($p < 0,05$). Isto indica que estes seis compostos atuam como feromônio sexual de fêmeas de *A. fraterculus* e são considerados, portanto, promissores como ferramenta de controle no manejo integrado desta praga.

Palavras-chave: Moscas-das-frutas, compatibilidade populacional, composição química

ABSTRACT

The *Anastrepha fraterculus* cryptic species complex is nowadays one of the most studied model of agricultural pest in terms of speciation and population compatibility. The improvement of the control techniques of this pest is necessary for the successful implementation of the sterile laboratory populations into the wild populations. The pheromone communication plays an important role in the mating behavioral of this species. The males aggregate in leks and emit volatiles, which attract females for mating, however the exact composition of the male pheromone blend was not elucidated yet. Therefore, the main goal of this study was (i) to investigate the male pheromone composition from seven populations of *A. fraterculus* complex from geographically distinct regions within Brazil and Argentina, (ii) to elucidate the chemical composition of the volatiles emitted by males from laboratory population originated from state Alagoas and to identify the compounds which mediate the behavioral response in conspecific females. The two-dimensional gas chromatography coupled to mass spectrometric time-of-flight detector (GC×GC/TOFMS) and consequently the multivariate analyses revealed quantitative and qualitative differences in the male born volatiles of the seven studied populations. Gas chromatography coupled to electroantennographic detector (GC-EAD) together with GC×GC/TOFMS analyses resulted in identification of 29 compounds in the aeration extracts of males from Alagoas population. The GC-EAD experiments with conspecific females from this population demonstrated that only six compounds, namely α -pinene, limonene, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol, (*E,E*)- α -farnesene and (*S,S*)-(-)-epianastrephin elicited depolarization in female antenna of this species. A synthetic mixture composed of EAD-active compounds elicited behavioral response in females similarly to headspace samples of conspecific males, whereas these two treatments elicited higher responses than a hexane control. This indicates that these six compounds act as sex pheromone for *A. fraterculus* females and therefore are considered as a promising tool for an effective control of this pest.

Keywords: fruit-flies, population compatibility, chemical composition

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Mapa da distribuição mundial de <i>A. fraterculus</i>	7
Figura 2. Distribuição de <i>Anastrepha fraterculus</i> no Brasil.....	7
Figura 3. Insetos adultos da espécie <i>A. fraterculus</i>	8
Figura 4. Ápices dos acúleos de <i>Anastrepha</i> sp.....	9
Figura 5. Ciclo biológico de <i>Anastrepha</i> sp.....	10
Figura 6. Goiaba atacada por moscas-das-frutas.....	11
Figura 7. Larvas de <i>A. fraterculus</i> em goiaba.....	11
Figura 8. Expansão da bolsa anal em machos de <i>A. fraterculus</i>	17
Figura 9. Desenho esquemático de um sistema de coleta de voláteis por aeração.....	18
Figura 10. Esquema de um cromatógrafo gasoso.....	21
Figura 11. Diagrama de blocos de um espectrômetro de massas.....	22
Figura 12. Diagrama de CG x CG.....	23
Figura 13. Esquema de um CG-EAG.....	24
Figura 14. Cromatograma obtido de uma análise por CG-EAG.....	25

CAPÍTULO 1

Figura 1. Rota de biosíntese proposta para cadeias de hidrocarbonetos ramificadas.....	51
Figura 2. Estrutura dos compostos descritos como feromônio de marcação de hospedeiro com efeito arrestante para <i>Anastrepha</i> spp. A. ludes. HMP: ácido N-(2,14-dimetil-1-oxopentadecil)-glutâmico; (R)-L: (L)-2(R)-2-(2,15-dimetilpentadecanoilamino-pentanodióico); DM-HMP: (ácido [L]-2-[(R)-2-metil pentadecanoilamino]-pentanodióico e; Anastrefamida: mistura diastereoisomérica 1:1 dos ácidos [L]-2-[(R)-2-metil-hexadecanoilamino]-pentanodióico e [L]-2-[(S)-2-metil-hexadecanoilamino]-pentanodióico.....	54

CAPÍTULO 2

- Figura 1. Localizações das sete populações do complexo de espécies crípticas *Anastrepha fraterculus*..... 73
- Figura 2. Comparação da área total do volátil na mistura liberada por cada grupo de 25 machos em chamamento de *Anastrepha fraterculus* das 6 populações brasileiras (AL-Alagoas, SJ-São Joaquim, PEL-Pelotas, VAC-Vacaria, BEN-Bento Gonçalves e PIR-Piracicaba) e 1 população da Argentina (TUC-Tucumán) 74
- Figura 3. Resultados da análise multivariada dos componentes principais (PCA) do feromônio sexual dos machos de *A. fraterculus* provenientes das sete diferentes populações de *A. fraterculus* (Bento Gonçalves-BEN 1-5, Pelotas-PEL 1-5, Piracicaba-PIRA 1-5, São Joaquim-SJ 1-5, Vacaria-VAC 1-5, Alagoas-AL 1-5 e Tucumán-TUC 1-5).. 76
- Figura 4. Resultados da análise de redundância (RDA) do feromônio sexual dos machos de *A. fraterculus* das sete populações diferentes (AL-Alagoas, SJ-São Joaquim, PEL-Pelotas, VAC-Vacaria, BEN-Bento Gonçalves e PIR-Piracicaba) e 1 população da Argentina (TUC-Tucumán)..... 77

CAPÍTULO 3

- Figura 1. Cromatograma representando a separação de compostos presentes nos extratos de aeração de *A. fraterculus*..... 94
- Figura 2. Cromatograma bidimensional obtido de extratos de aeração de machos de *A. fraterculus* onde: α -Pinene (1), limoneno (2), (Z)-3-nonen-1-ol (3), (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol (4), (E,E)- α -farneseno (5), e (S,S)-(-)-epianastrefina (6)..... 97
- Figura 3. Resposta comportamental de fêmeas de *A. fraterculus* para extratos de aeração de machos coespecíficos (cor preta), a mistura de seis compostos sintéticos: α -pineno, limoneno, (Z)-3-nonen-1-ol, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol, (E,E)- α -farneseno and (S,S)-(-)-epianastrefina (cor cinza) and hexano (controle, cor branca)..... 97

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Descrição dos compostos identificados na mistura feromonal de <i>Anastrepha</i> spp	48
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Compostos químicos (média da porcentagem relativa \pm % RSD) identificados pelo CG \times CG/TOF EM nos extratos de aeração dos machos em chamamento de <i>Anastrepha fraterculus</i> a partir das sete populações: PIR (Piracicaba), BEN (Bento Gonçalves), VCA (Vacaria), PEL (Pelotas), SJ (São Joaquim), TUC (Tucumán), AL (Alagoas).....	75
--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Compostos químicos (média percentual relative % \pm desvio padrão relativo) identificados por CG \times CG/TOFEM em extratos de aeração (N=10) de machos em chamamento de <i>Anastrepha fraterculus</i>	95
Tabela 2. Compostos EAD ativos (Média relative percentual \pm erro padrão) identificados em extratos de aeração (N=10) de machos em chamamento de <i>Anastrepha fraterculus</i>	96

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS.....	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Distribuição geográfica e importância econômica de <i>A. fraterculus</i> e seu principal hospedeiro.....	6
2.2. Descrição e ciclo de vida de <i>A. fraterculus</i>	8
2.3. Danos e formas de controle.....	10
2.4. O Complexo <i>Anastrepha fraterculus</i> (AF).....	14
2.5. Comportamento e feromônio sexual de <i>Anastrepha fraterculus</i>	16
2.6. Técnicas de extração de semioquímicos.....	18
2.6.1. Técnica de coleta de voláteis – Aeração.....	18
2.6.2. Extração por solvente.....	19
2.6.3. Microextração em fase sólida (SPME).....	19
2.7. Técnicas de isolamento e identificação de semioquímicos.....	20
2.7.1. Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....	20
2.7.2. Cromatografia Gasosa Bidimensional acoplada à Espectrometria de Massas com detector “Time-of-Flight” (CG x CG/TOF-EM).....	22
2.7.3. Cromatografia gasosa acoplada a detector eletroantegráfico (CG-EAG).....	24
REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO 1	37
SEMIOQUÍMICOS DE MOSCAS-DAS-FRUTAS DO GÊNERO <i>Anastrepha</i>	37
ABSTRACT.....	38
INTRODUÇÃO.....	39
Feromônio de agregação.....	41
<i>Anastrepha suspensa</i>	43
<i>Anastrepha ludens</i>	44

<i>Anastrepha obliqua</i>	45
<i>Anastrepha striata</i>	45
<i>Anastrepha serpentina</i>	46
<i>Anastrepha fraterculus</i>	46
Hidrocarbonetos cuticulares.....	49
Feromônio de marcação do hospedeiro.....	51
Interação dos compostos voláteis de moscas-das-frutas do gênero <i>Anastrepha</i> com as substâncias voláteis dos hospedeiros.....	53
CONCLUSÕES.....	57
AGRADECIMENTOS.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
CAPÍTULO 2	65
ANÁLISES DO FEROMÔNIO DO COMPLEXO DE ESPÉCIES CRÍPTICAS <i>Anastrepha fraterculus</i>	65
RESUMO.....	66
ABSTRACT.....	67
INTRODUÇÃO.....	68
MATERIAL E MÉTODOS.....	69
<i>Insetos</i>	69
<i>Coleta de Voláteis</i>	70
<i>CGxCG/TOF-EM</i>	70
ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	71
RESULTADOS.....	72
DISCUSSÃO.....	77
REFERÊNCIAS CITADAS.....	80
CAPÍTULO 3	86
IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO FEROMÔNIO SEXUAL EM <i>Anastrepha fraterculus</i> (DIPTERA: TEPHRITIDAE).....	86

RESUMO.....	87
ABSTRACT.....	88
INTRODUÇÃO.....	89
MATERIAL E MÉTODOS.....	90
<i>Coleta de insetos.....</i>	90
<i>Coleta de compostos voláteis de machos.....</i>	90
<i>Eletrofisiologia.....</i>	91
<i>Análises por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas.....</i>	92
<i>Compostos.....</i>	92
<i>Ensaio comportamentais.....</i>	92
<i>Análises Estatísticas.....</i>	93
RESULTADOS.....	93
DISCUSSÃO.....	98
REFERÊNCIAS.....	100
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com elevado potencial no que diz respeito à produção de frutas, graças a sua extensão territorial, posição geográfica, condições climáticas e de solo. Além disso, a organização das cadeias produtivas faz com que determinadas espécies frutíferas tenham conquistado mercados internacionais, conseguindo abastecê-los com excelência (POLL *et al.*, 2013). É ainda o 3º maior produtor mundial de frutas e, segundo dados do IBGE, com 42,6 milhões de toneladas produzidas em 2,2 milhões de hectares distribuídos pelo país (BRAZILIAN FRUIT, 2013).

Nesse sentido, a importância econômica de insetos-praga, tais como as moscas-das-frutas, deve-se aos danos causados aos frutos bem como às exigências quarentenárias impostas pelos países importadores. Invariavelmente, os frutos destinados à comercialização no mercado interno ou para exportações são atacados por espécies de moscas-das-frutas, afetando diretamente sua produção (NASCIMENTO; CARVALHO, 2000). Um destes, a goiaba (*Psidium guajava* L.) (Myrtaceae), é um dos mais atacados por esta praga no Brasil e, dentre as espécies de importância econômica mundial, estão agrupados cinco gêneros: *Ceratitis*, *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Rhagoletis* e *Dacus* (MALAVASI; ZUCCHI; SUGAYAMA, 2000). No Brasil, os gêneros *Ceratitis* e *Anastrepha* são os mais importantes economicamente, uma vez que algumas espécies infestam a maioria das frutas produzidas no país (ZUCCHI, 2000).

Anastrepha fraterculus (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) é uma praga polífaga altamente destrutiva, conhecida por constituir um complexo de espécies crípticas (denominado Complexo AF) que exhibe níveis consideráveis de isolamento reprodutivo pré e pós-zigótico. (SELIVON; PERONDINI; MORGANTE, 1999). Esse fato tem levado sua classificação em nível de morfotipos, os quais têm sido identificados, caracterizando oito espécies distintas, pertencentes a este complexo, desde os últimos levantamentos realizados (HERNÁNDEZ-ORTIZ *et al.*, 2012; HERNÁNDEZ-ORTIZ; CANAL; TRIGRERO, 2013). No Brasil, país com a maior variabilidade de espécies do complexo de AF, pelo menos três foram identificadas em diferentes regiões, as quais foram denominadas *Anastrepha fraterculus* sp.1 aff. *fraterculus*, *Anastrepha fraterculus* sp.2 aff. *fraterculus* e *Anastrepha fraterculus* sp.3 aff. *fraterculus* (SELIVON; PERONDINI, 1998; SELIVON *et al.* 2004, SELIVON; PERONDINI; MORGANTE, 2005).

Estudos realizados recentemente têm demonstrado diferenças na composição do feromônio sexual do complexo AF (CÁCERES *et al.*, 2009), implicando, em possíveis diferenças de resposta de atração de fêmeas para os compostos voláteis produzidos pelos machos. Além disso, estudos de compatibilidade sexual utilizando espécies deste complexo, oriundas de diferentes regiões, inclusive do Brasil (VERA *et al.*, 2006; DIAS, 2012), têm demonstrado que o cruzamento entre elas é reduzido ou praticamente inexistente.

Do ponto de vista de controle, na tentativa de conter o crescimento populacional destas moscas, muitos produtores utilizam grandes quantidades de agrotóxicos, sob a forma de isca tóxica ou através de pulverização em cobertura total (SALLES, 2001). Entretanto, a utilização indiscriminada destes produtos gerou, nas últimas décadas, uma série de problemas, tais como: a permanência de resíduos de agrotóxicos nos frutos, o desequilíbrio trófico e a seleção de organismos resistentes. Assim, a elucidação completa dos compostos presentes no feromônio sexual do macho, bem como sua abrangência e forma de atuação, pode ser uma poderosa ferramenta para o diagnóstico de populações diferentes desta espécie e provavelmente para sua inserção nas técnicas de manejo destas pragas no que se refere ao controle específico para as mesmas.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo geral reunir informações referentes aos estudos conduzidos dentro do complexo AF, identificar o feromônio sexual produzido por machos de diferentes localidades, determinando sua atividade biológica e eletrofisiológica, diante de fêmeas, para fins de futura aplicação no manejo integrado destas pragas. Para tanto, após uma breve revisão de literatura, a tese foi dividida em três capítulos: capítulo 1: Semioquímicos de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha*. O capítulo 2: Análise do feromônio do complexo de espécies crípticas *Anastrepha fraterculus* (Diptera:Tephritidae) e capítulo 3: Identificação e atividade eletrofisiológica dos componentes do feromônio sexual de *Anastrepha fraterculus* (Diptera:Tephritidae)".

Deste modo, com a reunião dos dados obtidos nos capítulos 1, 2 e 3, essa tese tem por objetivos específicos: (i) Relatar, através de uma revisão de literatura, os avanços na elucidação da comunicação química das espécies de *Anastrepha*; (ii) realizar um estudo comparativo de compostos voláteis produzidos por machos, a fim de descrever as diferenças ou semelhanças nas misturas voláteis produzidas por machos de 7 populações, do complexo *A. fraterculus*, geograficamente distantes e estabelecer se a composição química da mistura pode servir para o diagnóstico de identificação de populações de *A. fraterculus*; (iii) Identificar

compostos voláteis em extratos de aeração de machos de *A. fraterculus* envolvidos na atração das fêmeas co-específicas e (iv) testar a eficiência de uma mistura sintética constituída de compostos eletrofisiologicamente ativos na atração de fêmeas de *A. fraterculus*.

REFERÊNCIAS

BRAGA-SOBRINHO, R.; MALAVASI, A.; MESQUITA, A. L. M.; OMETO, A. C. F. **Manual operacional para levantamento, detecção, monitoramento e controle de moscas-das-frutas**. Fortaleza - CE: Embrapa Agroindústria Tropical, p. 29, 2001.

BRAZILIAN FRUIT, 2013. **Programa de Promoção das Exportações das Frutas Brasileiras e Derivados**. Disponível em: <<http://www.brazilianfruit.org/Pbr/Fruticultura/Fruticultura.asp>>. Acesso em: 02 de Julho de 2013 as 09:45 h.

CÁCERES, C. et al. Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 97, p. 152-165, 2009.

DIAS, V.S. **Compatibilidade de acasalamento de populações do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) do Brasil**. Salvador, Bahia, 2012. Dissertação de mestrado.

HERNANDEZ-ORTIZ, V., CANAL, N. A. TRIGRERO, J. Morphometrics of wild populations from Ecuador and Colombia of the *Anastrepha fraterculus* complex: The eighth passenger. In: **3rd Workshop of Resolution of Cryptic Species Complexes of Tephritid Pests to Overcome Constraints to SIT Application and International Trade; FAO/IAEA**, Tucumán, Argentina, 2013.

HERNÁNDEZ-ORTIZ, V. et al. Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae): a multivariate approach for the recognition of South American morphotypes. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 105, p. 305-318, 2012.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A.; SUGAYAMA, R. L. Biogeografia In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Org.). **Moscas das frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, p. 93-98, 2000.

NASCIMENTO, A. S.; CARVALHO, R. S. Manejo Integrado de moscas-das-frutas. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Org.) **Moscas das frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, p. 169-173, 2000.

POLL, H. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2013. 136 p.

SALLES, L. **Conheça e controle o terror dos pomares. Mosca-das-frutas**. Caderno Técnico, Pelotas:EMBRAPA-CPACT, 2001.

SELIVON, D. ; PERONDINI, A. L. P. ; MORGANTE, J. S. Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 4, p. 507-510, 1999.

SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P. Eggshell morphology in two cryptic species of *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 91, p. 473-478, 1998.

SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P.; MORGANTE, J. S. A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, n. 3, p. 367-381, 2005.

SELIVON, D. et al. New variant forms in the *Anastrepha fraterculus* complex. In **Proc. 6th International Fruit Flies Symposium**, B. Barnes (org.), Isteg Scientific Publications, Irene, South Africa, 2004.

VERA, M. T. et al. Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Society of America**, v. 99, p.387-397, 2006.

ZUCCHI, R. A. Taxonomia In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Org.) **Moscas das frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2000

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Distribuição geográfica e importância econômica de *A. fraterculus* e seu principal hospedeiro

Segundo Cunha *et al.* (1993), são descritos seis gêneros de tefritídeos infestadores de frutos, *Dacus*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Toxotrypana*, *Anastrepha* e *Rhagoletis*, com ampla distribuição mundial. No Brasil, são encontrados os gêneros *Anastrepha* e *Ceratitis*. Os demais não ocorrem no país ou se limitam a atacar plantas nativas, destituídas de interesse comercial.

A mosca-das-frutas sul americana, *A. fraterculus*, é de origem neotropical, ocorrendo do sul dos EUA até o norte da Argentina (**Figura 1**) (MALAVASI; SUGAYAMA, 2000; ZUCCHI, 2000a). Esta espécie está ausente em cinco estados brasileiros, sendo quatro da região norte (Acre, Amazonas, Rondônia e Roraima) e um da região centro-oeste (Mato Grosso) (ZUCCHI, 2007; SILVA; LEMOS; ZUCCHI, 2011). Em alguns Estados do Brasil, tais como Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, esta é a espécie predominante, sendo que para o primeiro, segundo dados de Salles, Kovalski (1990), representa cerca de 95% de *Anastrepha* spp. A distribuição de *A. fraterculus* no Brasil está descrita na **Figura 2**.

A praga *A. fraterculus* é considerada uma das espécies mais polífagas de moscas-das-frutas. Devido aos danos causados por ela, têm sido estabelecidas numerosas barreiras quarentenárias. Sua importância econômica pode variar segundo o país, a região, o hospedeiro e a época do ano. Em algumas regiões elas chegam a comprometer 100% da produção de frutos e podem infestar mais de 400 espécies de frutos, sendo considerada uma das principais pragas, que afetam a fruticultura em todo o mundo (AGUIAR; NASCIMENTO, 2011).

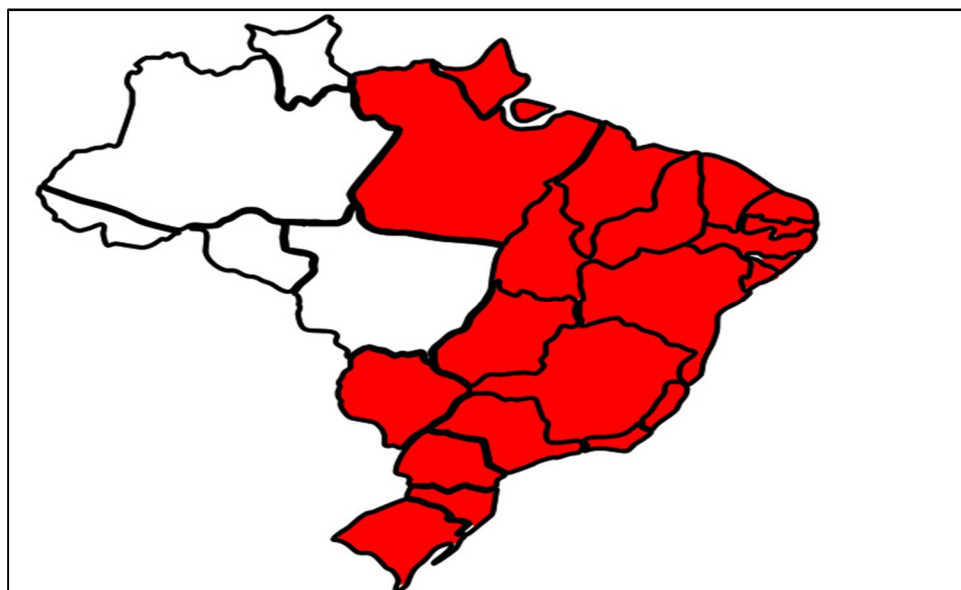
Associadas a *A. fraterculus* são registradas 81 espécies de plantas hospedeiras em vinte famílias botânicas, sendo que Myrtaceae destaca-se como uma das principais famílias com hospedeiros primários para a praga. Esta família de plantas é muito diversificada no Brasil abrangendo em torno de 1.000 espécies e, além disso, inclui alguns representantes de importância econômica tais como a goiabeira (*Psidium guava* L.) (MALAVASI; SUGAYAMA, 2000; ZUCCHI, 2000a, 2007, 2008).

Figura 1 - Mapa da distribuição mundial de *A. fraterculus*



Fonte: Adaptado de FAO/IAEA [2014]

Figura 2 - Distribuição de *Anastrepha fraterculus* no Brasil



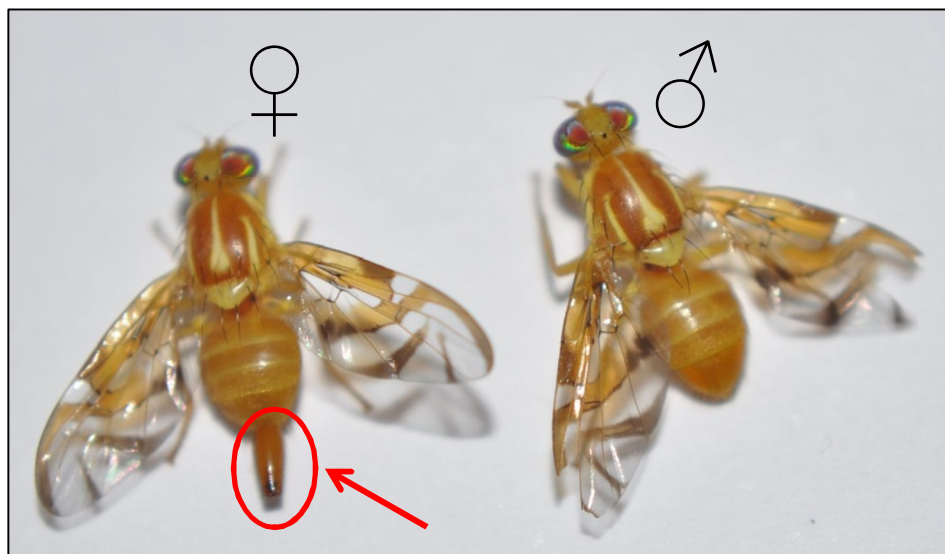
Fonte: Dados coletados de Zucchi (2007); Silva; Lemos; Zucchi (2011)

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de goiaba sendo que a região nordeste é responsável por aproximadamente 50% da área colhida deste fruto (6.951 hectares), destacando o Estado de Pernambuco como maior produtor brasileiro (98.955 toneladas) (AGRIANUAL, 2012), e o Estado do Ceará como principal Estado exportador (SEBRAE, 2013).

2.2. Descrição e ciclo de vida de *A. fraterculus*

Os insetos adultos de *A. fraterculus* medem cerca de 7,0 a 8,0 mm de comprimento, são amarelados com tonalidade marrom, especialmente no abdôme, cabeça e pernas. Apresenta tórax preto e faixa negra na margem anterior das asas e com olhos de coloração variável. O macho apresenta o abdômen arredondado, enquanto que a fêmea tem acúleo em formato de faca, medindo cerca de 1,2 mm de comprimento (**Figura 3**) (MALAVASI, 2009). Na fêmea, a parte que vai da margem posterior da cloaca até a extremidade final do acúleo é chamada de ápice do acúleo, principal característica para a identificação da espécie de mosca-das-frutas. Assim salvo pouquíssimas exceções, a identificação segura só pode ser baseada neste sexo (**Figura 4**) (ZUCCHI, 2000a).

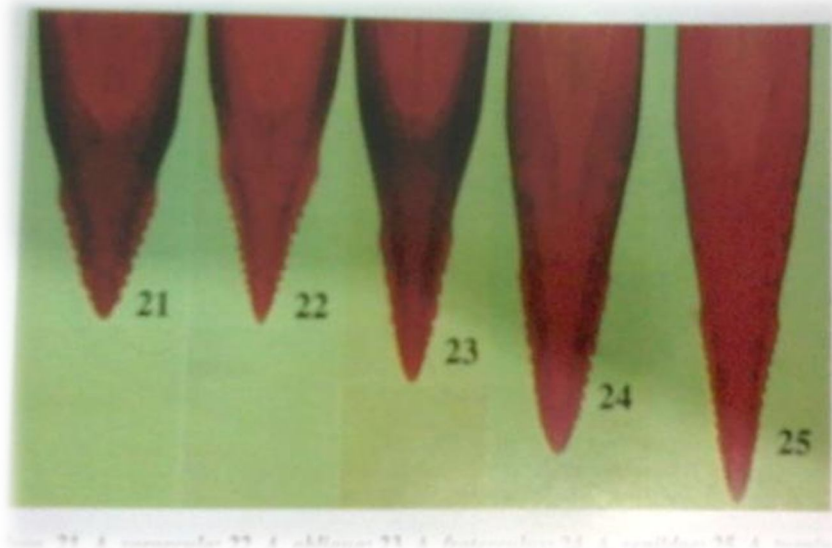
Figura 3 - Insetos adultos da espécie *A. fraterculus*



Descrição: A seta vermelha indica o detalhe do acúleo, presente em fêmeas.

Fonte: Autor, [2013].

Figura 4 – Ápices dos acúleos de *Anastrepha* sp.



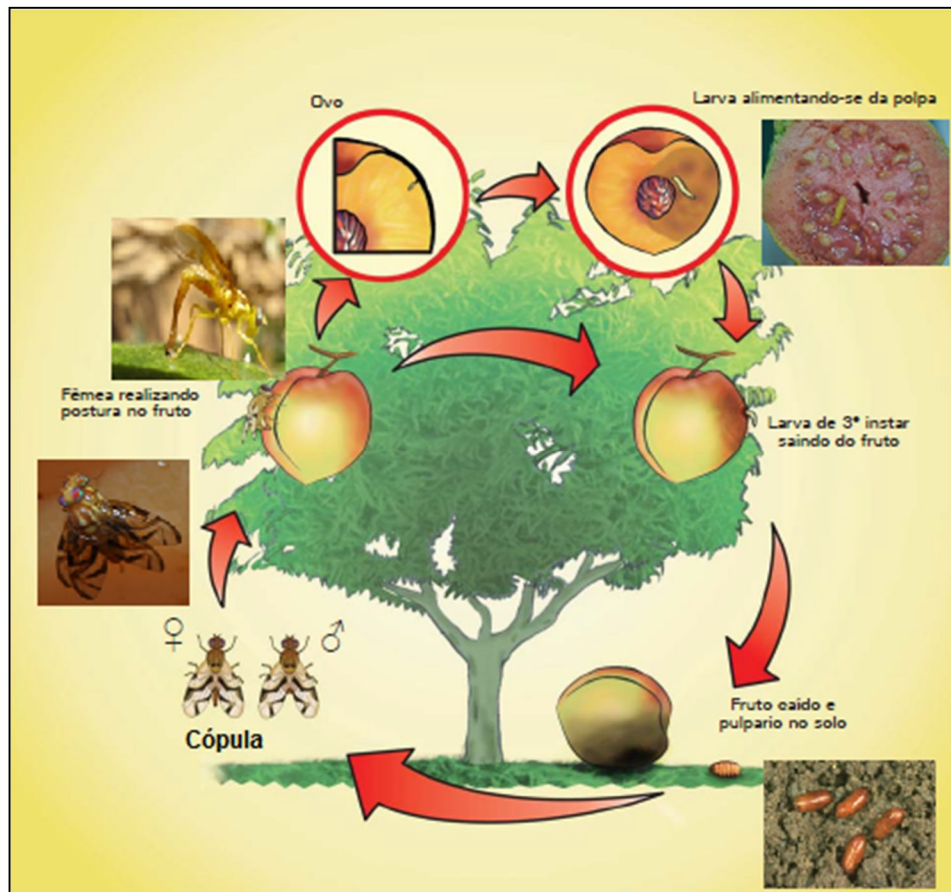
Descrição: 21. *A. sororcula*; 22. *A. obliqua*; 23. *A. fraterculus*; 24. *A. zenildae*; 25. *A. turpinae*.

Fonte: Adaptado de Zucchi, [2000].

As moscas-das-frutas são insetos fitófagos em cujo estágio larval se alimenta de tecidos vegetais, na maior parte dos casos, da polpa de frutas. As espécies *A. fraterculus* completam o seu desenvolvimento através de quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto. Cada um destes estágios possui peculiaridades inerentes de seu próprio desenvolvimento e, além disso, seu desempenho está condicionado basicamente a dois componentes do meio onde vivem, o clima e o hospedeiro (SALLES, 2000).

Estudos conduzidos com *A. fraterculus* oriundas da região nordeste detectaram que o período de ovo-adulto (**Figura 5**) leva cerca de 22 dias em condições climáticas favoráveis (26 °C e 70 % UR). A fase de ovo dura de 1 a 2 dias, o estágio larval de 6-9 dias e o de pupa 8-9 dias. Os adultos atingem a maturidade sexual 8-12 dias após a emergência. O ciclo de vida é de aproximadamente 30 dias. Além disso, machos e fêmeas recém-emergidos forrageiam ativamente por alimento necessitando de proteína para a maturação de ovócitos e espermatozoides. Eles se alimentam de frutos em decomposição, néctar de plantas, excrementos de aves, secreções de afídeos e outras substâncias (MALAVASI, 2009).

Figura 5 – Ciclo biológico de *Anastrepha* sp.



Fonte: Adaptado de Nava; Botton [2010]

2.3. Danos e formas de controle

As moscas-das-frutas causam danos de grande proporção a diversas culturas, a saber: mamão, citros, goiaba, manga, carambola, pêssigo, maçã, pitanga, acerola, etc. Os frutos atacados pelas moscas apresentam injúrias bem características: em volta do local onde foi feita a postura aparece um halo com aproximadamente 2 cm de diâmetro e coloração escura (**Figura 6**) (BIOCONTROLE, 2013).

A larva alimenta-se da polpa e a perfuração do fruto caracteriza-se como uma “porta de entrada” para micro-organismos muitas das vezes oportunistas ao ataque. Ao se alimentarem da polpa dos frutos (**Figura 7**), essas larvas aceleram o processo de amadurecimento e a decomposição ocorre a partir da ação de fungos que penetram pelos orifícios deixados durante a postura, inutilizando ou depreciando o produto, tanto para

industrialização como para consumo *in natura* (GOULD; SHARP, 1990; NASCIMENTO *et al.*, 1992).

Figura 6– Goiaba atacada por moscas-das-frutas



Fonte: Autor, [2013]

Figura 7 – Larvas de *A. fraterculus* em goiaba



Fonte: Autor [2013]

De acordo com Morgante (1991), o controle das moscas-das-frutas é usualmente feito com iscas tóxicas, pulverização em cobertura com agrotóxicos e, em algumas fruteiras, faz-se o ensacamento individual dos frutos, impedindo ou dificultando a oviposição. O controle tradicional, mediante o uso de agrotóxicos, é de alto custo, provoca contaminação ambiental e, dada a sua inespecificidade, reduz não só a população das espécies polinizadoras, mas também dos inimigos naturais das espécies-praga. Embora menos drástico, o controle feito

por iscas inseticidas também provoca danos, pois, da mesma maneira, atrai e mata várias espécies de insetos (MALAVASI, 2009).

O controle de qualquer espécie de praga deixou de ser apenas a aplicação sistemática de produtos químicos para tornar-se um conjunto de medidas que visam realizar o controle eficiente e com responsabilidade sócio-ambiental (GALLO *et al.*, 2002). Este conceito de controle de insetos-praga é um dos pilares do método que é conhecido como Manejo Integrado de Pragas - MIP.

A principal maneira para que o manejo integrado das moscas-das-frutas seja eficiente é a harmonização da associação do controle biológico, químico, cultural e genético (BRAGA-SOBRINHO *et al.*, 2001).

i) Cultural

Segundo Nascimento; Carvalho (2000) os métodos mais recomendados para o controle cultural de tefritídeos são:

- ✓ Coleta e destruição de frutos: os frutos são colhidos de forma manual em pomares ou de frutíferas isoladas e posteriormente enterrados, quebrando o ciclo da praga. Este método é o mais eficiente.
- ✓ Ensacamento de frutos: é viável para frutos mais suscetíveis e com alto valor comercial, devendo ser realizado antes de estarem maduros.
- ✓ Poda das árvores: é realizada para as espécies frutíferas que a prática é recomendada, facilitando a eficiência das iscas tóxicas e reduzindo a área de proteção de adultos.

ii) Biológico

A principal função do controle biológico é direcionar o controle para a praga-alvo, reduzindo custos e a contaminação de animais e do meio ambiente por produtos químicos. Assim, o intuito deste método é reduzir a densidade populacional da praga e favorecer o aumento populacional de seus inimigos naturais para que haja um equilíbrio ecológico (CARVALHO *et al.*, 2000).

Diversos agentes de controle (bactérias, fungos, vírus, nematoides predadores e parasitóides) de tefritídeos são responsáveis pela redução parcial desta praga e podem ser utilizados em programas de controle, no entanto, é necessário realizar mais estudos para desenvolver metodologias e técnicas de criações para a aplicação no campo (CARVALHO *et*

al., 2000). Devido ao hábito das larvas de tefritídeos empuparem no solo, estas, teoricamente, estariam suscetíveis aos fungos entomopatogênicos ali presentes (CARVALHO *et al.*, 2000). BECHARA *et al.* (2011) verificaram em laboratório que *Metarhizium anisopliae* (linhagem E9) aplicado no solo pode causar infecção, doença e até a morte de estágios imaturos de *A. fraterculus*.

É conhecida a suscetibilidade de algumas espécies de moscas frugívoras a nematóides entomopatogênicos. *Heterorhabditis bacteriophora* demonstrou potencial como agente de controle biológico de larvas de *A. serpentina* em condições de laboratório, no entanto, é necessário que se realizem estudos no campo para que a sua eficiência seja confirmada (TOLEDO *et al.*, 2006). Os agentes de controle biológico mais estudados e utilizados nos programas de controle de moscas-das-frutas são os parasitoides de larvas (microhimenópteros).

No Brasil existem muitas espécies nativas de parasitoides, tais como os braconídeos *Doryctobracon areolatus* (Szépliget, 1911), *Doryctobracon brasiliensis* (Szépliget, 1911), *Doryctobracon fluminensis* (Lima, 1938), *Opius bellus* (Gahan, 1930) e *Utetes anastrephae* (Viereck, 1913); o figitídeo *Aganaspis pelleranoi* (Bréthes, 1924) e o pteromalídeo *Pachycrepoideus viriendemniae* (Rondani, 1875) que parasitam larvas e pupas de moscas dos gêneros *Anastrepha* e *Ceratitis* (CANAL DAZA, 1996; ZUCCH, 2000b).

iii) Químico

Este método de controle consiste na aplicação de compostos químicos que quando aplicados direta ou indiretamente sobre os insetos provocam a sua morte (GALLO *et al.*, 2002). O controle químico é muito utilizado em programas de controle e erradicação de moscas-das-frutas em diversos países, podendo ser realizado com aplicações de iscas tóxicas por via terrestre ou aéreas, normalmente, estas iscas são compostas por 90% de atrativo alimentar e 10% de inseticida (BRAGA-SOBRINHO *et al.*, 2001). Para as iscas tóxicas com atrativo alimentar emprega-se o uso de inseticida orgânico a base de espinosina (spinosad) que atua por ingestão e é associado com um atrativo alimentar. Além do spinosad, tem sido empregado por décadas, o organofosforado malation que embora ainda usado, está sendo gradualmente substituído pela isca inseticida. Para *Bactrocera* ssp usa-se o atrativo sexual, metil eugenol, e o inseticida para atração dos machos que após ingerirem a mistura morrem em poucos minutos. A mistura paraferomônio-inseticida pode ser aplicada com

bomba acionada com ar comprimido associada com um agente aderente ou aplicada em algum substrato como blocos de madeira e distribuídos no ambiente, em geral penduradas nas plantas hospedeiras (MALAVASI, 2009).

iv) Técnica do Inseto Estéril (TIE)

A TIE consiste na liberação de um grande número de machos estéreis no ambiente onde eles copulam com as fêmeas da natureza, transferindo espermatozoides inviáveis. O resultado é a não fecundação dos óvulos das fêmeas e a conseqüente redução populacional. Aplicada, semanalmente, e por certo período de tempo – meses ou anos – a TIE é usada em programas de erradicação, de supressão ou ainda de prevenção (MALAVASI, 2009).

v) Genético

O melhoramento genético de frutíferas na busca de variedades resistentes às moscas-das-frutas é uma das melhores alternativas de controle, pois este método além de reduzir a população de tefritídeos pragas também é compatível com todos os outros métodos (BRANCO; VENDRAMIM, DENARDI *et al.*, 2000).

2.4. O Complexo *Anastrepha fraterculus* (AF)

Segundo Ridley (2006), as espécies são identificadas principalmente por suas características morfológicas. Algumas espécies podem exibir diferenças comportamentais, ecológicas e genéticas e não apresentar distinção morfológica sendo denominadas de espécies crípticas, ou seja, estas espécies são isoladas reprodutivamente, mas não morfologicamente (MAYR, 2001; RIDLEY, 2006).

Complexos de espécies crípticas são comuns em vários grupos tais como peixes, anfíbios, insetos, fungos e plantas (BICKFORD *et al.*, 2007). O surgimento de espécies crípticas em alguns desses táxons pode ser explicado por três hipóteses. A primeira hipótese afirma que a mudança em características morfológicas pode não ocorrer devido a um recente processo de especiação (LANDRY *et al.*, 2003). De acordo com a segunda hipótese, táxons que utilizam algum tipo de sinal como sons e feromônios para o reconhecimento dos parceiros compreendem um grande número de espécies crípticas, pois a mudança nesses sinais pode não refletir em uma mudança morfológica (BICKFORD *et al.*, 2007). A terceira hipótese

postula que alguns grupos não apresentam características morfológicas que possam ser utilizadas para a distinção das espécies, como ocorre em certas espécies de esponjas e nematoides (KLATAU *et al.*, 1999; BLOUÍN, 2002).

Os primeiros registros de espécies crípticas em *A. fraterculus* foram descritos por Stone (1942), o qual, através da observação de caracteres morfológicos das asas considerou-as como raças geográficas. Em 1944, Baker sugeriu a existência de um complexo de espécies crípticas, o qual foi confirmado posteriormente utilizando diversas características biológicas, como cariótipo (MENDES, 1958; BUSH, 1962; SOLFERINI & MORGANTE, 1987; MORGANTE *et al.*, 1993); isozimas (MORGANTE *et al.*, 1980, BAKER *et al.*, 1980; STECK 1991; AMARAL, 1994; ALBERTI *et al.*, 1999, 2002; BASSO *et al.*, 2003); DNA mitocondrial (STECK; SHEPPARD, 1993; SANTOS, 1994); RNA 16S mitocondrial (MCPHERON *et al.*, 1999), gene citocromo oxidase I (COI mitocondrial) (SMITH-CALDAS *et al.*, 2001) e o gene nuclear (BARR *et al.*, 2005).

No Brasil, diversos trabalhos relataram diferenças nos cariótipos (SELIVON *et al.*, 2004a, 2005, GODAY *et al.*, 2006), na estrutura dos ovos (SELIVON; PERONDINI, 1998, SELIVON *et al.*, 2004a, FIGUEIREDO *et al.*, 2011), em isozimas (SELIVON *et al.*, 1996; SELIVON; PERONDINI; MORGANTE, 2005), na morfometria de estruturas dos adultos (SELIVON *et al.*, 2004b; SELIVON; PERONDINI; MORGANTE, 2005), isolamento reprodutivo (SELIVON; PERONDINI; MORGANTE, 1999; SELIVON; PERONDINI; MORGANTE, 2005), caracterizando a existência de três espécies no complexo que foram denominadas, provisoriamente por *Anastrepha* sp.1 aff. *fraterculus*, *A.* sp2 aff. *fraterculus* e *A.* sp3 aff. *fraterculus*. Além dessas, SELIVON *et al.* (2004b) caracterizou outra entidade, *A.* sp4 affinis *fraterculus*, encontrada em Guayaquil, Equador.

Hernández-Ortiz *et al.* (2004) e Prezotto (2008), analisando amostras de diversas localidades do México, Peru, Equador, Colômbia, Brasil e Argentina, mostraram que outras espécies devem existir no complexo de espécies crípticas de *A. fraterculus*. Vera *et al.* (2006) encontraram isolamento reprodutivo entre populações de diversas localidades do Peru, Colômbia, Brasil e Argentina, no entanto, foi verificada compatibilidade entre Brasil e Argentina. Além disso, amostras de *A. fraterculus* de populações da Argentina e do Peru

apresentaram diferenças comportamentais, químicas, citológicas e genéticas, indicando pertencerem a diferentes entidades biológicas (CÁCERES *et al.*, 2009).

Hernández-Ortiz *et al.* (2012) demonstraram a presença de, ao menos, sete morfotipos distintos dentro deste complexo de espécies e, recentemente foi incluído um morfotipo equatoriano, totalizando oito morfotipos distintos (HERNÁNDEZ-ORTIZ; CANAL; TRIGRERO, 2013). Segundo estes autores, de acordo com as áreas biogeográficas das Américas, as populações que ocorrem no domínio Mesoamericano (México, Guatemala e Panamá) foram agrupadas em uma única entidade, rotuladas como morfotipo "Mexicano". No noroeste do domínio Sul-americano, as amostras caíram em três grupos distintos: o morfotipo "Venezuelano", com uma única população das planícies do Caribe venezuelano; o "Andino", morfotipo das terras altas da Venezuela e da Colômbia, e o terceiro grupo ou morfotipo "Peruano", compreendendo as amostras das planícies costeiras do Pacífico no Equador (A. sp.4) e Peru.

Três grupos adicionais foram identificados nas sub-regiões do Chaco e Paranaense correspondentes às três entidades caracterizadas por Selivon *et al.* (2004a) e Selivon; Perondini; Morgante (2005): o morfotipo "Brasileiro-1" (A. sp.1) foi reconhecido como o mais comum ao Brasil, incluindo as amostras da Argentina, e amplamente distribuído nessas regiões biogeográficas; o morfotipo "Brasileiro-2" (A. sp.2), incluindo duas amostras do estado de São Paulo (Ilhabela e São Sebastião) e o morfotipo "Brasileiro-3" (A. sp.3) incluiu uma única população de Botucatu (estado de São Paulo) (HERNÁNDEZ-ORTIZ *et al.*, 2012). Com base em dados publicados anteriormente (acima citados) que mostram diferenciação genética e cariotípica, bem como isolamento reprodutivo entre alguns desses grupos, Hernández-Ortiz *et al.* (2012) concluíram que esses morfotipos de fato representam grupos naturais e entidades taxonômicas distintas.

2.5. Comportamento e feromônio sexual de *Anastrepha fraterculus*

Qualquer substância química que liberada por um determinado organismo provoque uma mudança fisiológica e/ou comportamental em um outro organismo é denominada de semioquímico e, quando possuem ação intraespecífica, ou seja, se atuam entre organismos de uma mesma espécie, são denominadas feromônios. Estes, mediando atração entre

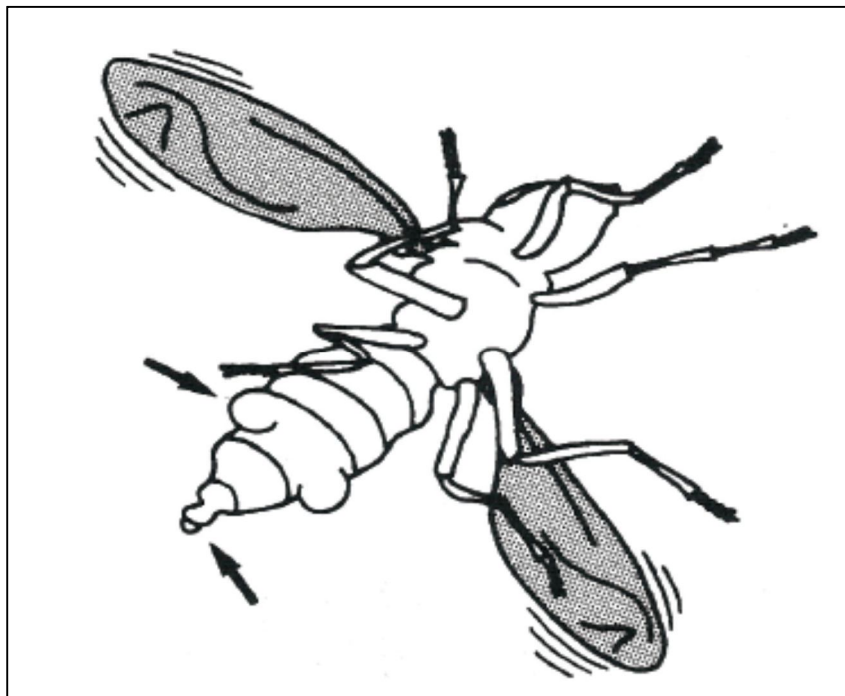
indivíduos de sexo oposto objetivando o acasalamento são considerados feromônios sexuais (CORRÊA; SANT'ANA, 2001).

Quanto ao repertório do comportamento sexual de *A. fraterculus*, sabe-se que ele é complexo, heterogêneo e com alta plasticidade fenotípica (ALUJA *et al.*, 2000; CENDRA, 2007). O sistema de acasalamento desta espécie é baseado em “leks” (MALAVASI; MORGANTE; PROKOPY, 1983), definidos como agregações de três ou mais machos nas folhas de uma árvore com o objetivo de atrair, cortejar, a partir de um repertório comportamental caracterizado por estímulos visuais e acústicos e copular com a fêmea (FIELD; KASPI; YUVAL, 2002; SEGURA *et al.* 2007). Por intermediarem a atração de machos e fêmeas de uma mesma espécie, os sinais químicos empregados por machos de *A. fraterculus* são também denominados feromônios de agregação (LANDOLT, 1997).

A liberação dos atraentes sexuais é feita pela distensão lateral da cutícula abdominal na altura do terceiro ao quinto segmentos, formando bolsas que estão associadas às glândulas exócrinas pleurais. Além dessa via, as substâncias atraentes são também oriundas de secreções intestinais, as quais são liberadas no momento em que o tecido anal é evertido, apresentando uma gotícula de secreção na extremidade do abdome e pela extensão e retração das partes bucais, que estão associadas às glândulas salivares (MALAVASI; BARROS, 1988; NATION, 1989; LANDOLT; AVERILL, 1999). Durante o período de expansão das bolsas abdominais e da bolsa anal, o macho mantém as asas em ângulo reto ao corpo (**Figura 8**), vibrando-as periodicamente em alta frequência por um período de um a três segundos.

Em adição aos sons produzidos, os quais possivelmente funcionam na comunicação, a vibração de asas ajuda na dispersão dos atraentes sexuais, uma vez que, direciona um jato de ar sobre as referidas bolsas, além de elevar a temperatura do corpo como resultado do trabalho metabólico realizado. Frequentemente, após um período de vibração de asas, o inseto toca a superfície da folha com a extremidade do abdome, provavelmente depositando pequenas quantidades de atraente sexual. Em seguida, o macho gira o corpo em outra direção e repete a vibração de asas e o toque sobre a superfície da folha com a extremidade do abdome (NATION, 1989).

Figura 8 – Expansão da bolsa anal em machos de *A. fraterculus*



Fonte: Adaptado de LIMA; HOUSE [1997]

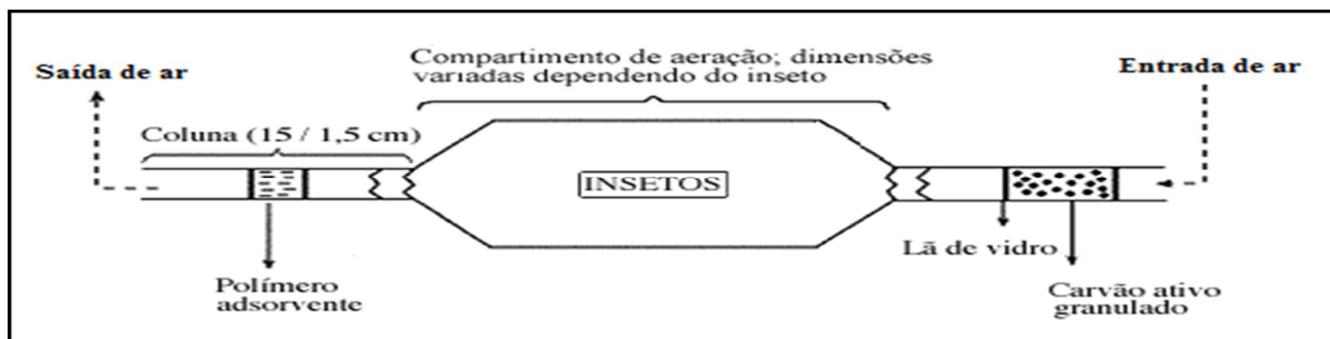
2.6. Técnicas de extração de semioquímicos

As principais técnicas empregadas na extração de compostos voláteis liberados por insetos são a extração por aeração e a extração por solvente (ZARBIN, 2001).

2.6.1. Técnica de coleta de voláteis - Aeração

Por meio do processo de aeração, também denominada de *Headspace dinâmico*, todos os voláteis liberados por insetos, o que inclui os feromônios, são coletados (ZARBIM, 2001). A aeração é um método para coleta de voláteis de amostras complexas podendo ser esquematizado como mostra na **Figura 9**.

Figura 9 – Desenho esquemático de um sistema de coleta de voláteis por aeração



Fonte: Zarbim [2001]

Os compostos voláteis liberados pelos insetos são aprisionados em materiais adsorventes como sílica, carvão ativo e polímeros porosos (Porapak Q, Tenax® etc.) e sua dessorção é realizada utilizando-se uma pequena quantidade de solventes como diclorometano, hexano e éter com um alto grau de pureza, pois, desta forma, aumenta o rendimento da extração e diminui o grau de impurezas. A preferência por tais solventes deve-se à sua volatilidade, o que possibilita a evaporação sem que os materiais coletados sejam expostos a altas temperaturas. Os sistemas de aeração utilizados geralmente são de vidro ou de materiais que não liberem voláteis, pois podem causar a contaminação da amostra. Na aeração as coletas normalmente são realizadas em ciclos de 24 horas, e sempre com temperatura e fotoperíodo controlado (ZARBIN, 2001).

2.6.2. Extração por solvente

A extração por solvente é amplamente empregada na obtenção de extratos de glândulas ou de partes do corpo do inseto. Para se extrair a glândula é necessário que a mesma seja extraída do corpo do inseto e posteriormente transferida para um recipiente contendo o solvente, geralmente de baixa polaridade como diclorometano ou hexano. Quando a extração é realizada a partir do corpo ou seções do corpo do inseto, outros compostos que

não fazem parte do elenco da secreção presente na glândula exócrina podem ser detectados. O material coletado sempre irá apresentar uma quantidade muito maior de impurezas, tais como hidrocarbonetos, ácidos graxos e outros (ZARBIN; FERREIRA; LEAL, 1999).

2.6.3. Microextração em fase sólida (SPME)

Além da aeração e da extração por solvente, outra técnica para extração de voláteis de insetos é a microextração em fase sólida (SPME), que consiste no emprego de uma fibra de sílica fundida envolta por uma camada de adsorvente (polímero poroso), na qual os compostos são adsorvidos, sendo posteriormente dessorvidos termicamente no injetor do cromatógrafo gasoso (NASCIMENTO; SANT'ANA, 2001).

2.7. Técnicas de isolamento e identificação de semioquímicos

2.7.1. Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

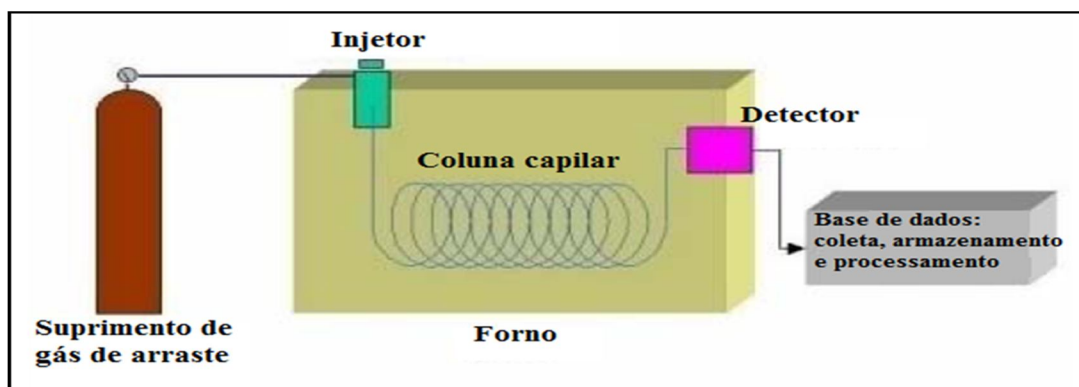
Para o isolamento e identificação de semioquímicos normalmente é empregado uma técnica cromatográfica seguida por algum método espectroscópico. O método mais eficiente até o momento é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), isso devido à quantidade excessivamente pequena de material produzido e liberado pelo inseto que são na ordem de 10^{-6} - 10^{-9} gramas (NASCIMENTO; SANT'ANA, 2001).

A cromatografia é um método físico-químico de separação que está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Por sua vez, na cromatografia gasosa, os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa (denominada gás de arraste) e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro da coluna. Ao realizar-se uma separação por cromatografia gasosa, a amostra é vaporizada e injetada na cabeça da coluna cromatográfica. A eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte. Em contraste, com muitos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito; sua única função é transportar o analito através da coluna (SKOOG, 2006).

Um aparelho de cromatografia gasosa é composto por quatro partes conforme descrito no esquema da **Figura 10**. O injetor, por onde é introduzida a amostra, sendo também responsável pela vaporização do extrato; a coluna – localizada no interior de um forno, cuja função é separar os constituintes do extrato; o detector, responsável pela captação de cada composto separado pela coluna; e um registrador que condensa os sinais emitidos pelo detector e os converte na forma de gráfico. O gráfico obtido é denominado cromatograma, e cada pico registrado correspondem a um composto, ou a uma mistura de isômeros racêmicos (ZARBIN, 2001).

Figura 10 – Esquema de um cromatógrafo gasoso

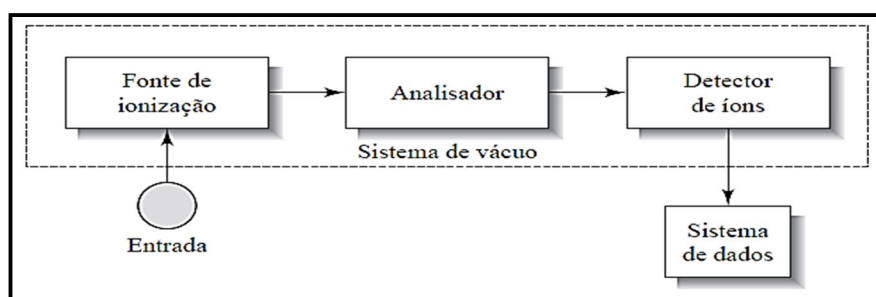


Fonte: SANTOS [2003]

A identificação dos compostos presentes na amostra ocorre por comparação dos tempos de retenção dos compostos e comparação com resultados descritos na literatura e pela espectrometria de massas, que consiste na ionização/fragmentação dos compostos que foram previamente separados pelo cromatógrafo. A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção. Um dos detectores mais poderosos para a cromatografia gasosa é o espectrômetro de massas, uma vez que combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (ZARBIM, 2001).

Um diagrama de blocos de um espectrômetro de massas é mostrado na **Figura 11**. No espectrômetro de massas, a amostra entra na fonte de ionização através de um sistema de entrada. As moléculas da amostra são convertidas a íons e frequentemente fragmentadas na fonte de ionização. Então, os íons passam para o analisador no qual são separados de acordo com a suas razões massa/carga. A seguir, os íons separados atingem um detector de íons no qual produzem um sinal elétrico que é registrado e representado na forma de gráfico pelo sistema de dados (SKOOG *et al.*, 2006).

Figura 11 - Diagrama de blocos de um espectrômetro de massas.



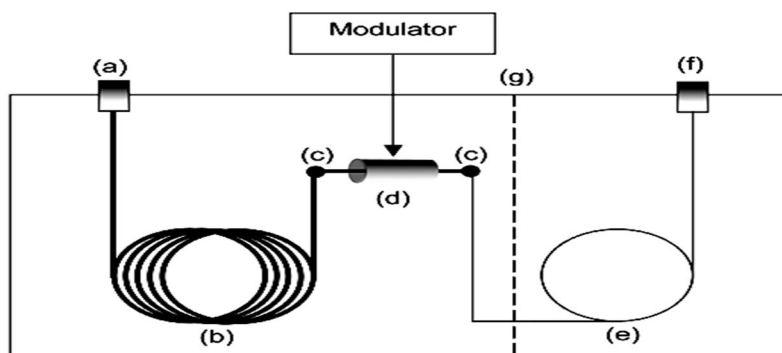
Fonte: SKOOG *et al.* [2006]

2.7.2. Cromatografia Gasosa Bidimensional acoplada à Espectrometria de Massas com detector “Time-of-Flight” (CG x CG/TOF-EM)

A Cromatografia Gasosa Bidimensional acoplada à Espectrometria de Massas com detector “Time-of-Flight” (CG x CG/TOF-EM) é uma técnica analítica que oferece uma solução para o problema da co-eluição dos compostos encontrada na CG unidimensional, pois ela apresenta uma alta sensibilidade e seletividade. Nesta técnica, é possível analisar misturas voláteis complexas e em baixas concentrações do analito. O método consiste de dois sistemas de CG (CG x CG) equipado com duas colunas de polaridades diferentes, conectados por um modulador que é o componente fundamental na CG x CG, pois ele coleta continuamente pequenas frações da amostra da primeira coluna (1D), reconcentra-as em uma banda estreita e rejeita-as na segunda coluna (2D) (PEDROSO *et al.*, 2009).

O esquema da **Figura 12** mostra o diagrama das etapas de um Cromatógrafo gasoso bidimensional. A princípio, a amostra é injetada (a) na primeira coluna (b) onde os compostos são eluídos e carregados por um gás de arraste (gás inerte) até o modulador (c) criogênico, onde ocorre o resfriamento através de jatos de CO₂ ou de N₂ líquido diretamente na coluna. Este modulador condensa repetidamente os compostos eluídos na coluna principal e libera periodicamente todo eluente como pulsos curtos na segunda coluna (d). Os fragmentos gerados são capturados por um detector (e), onde os dados obtidos são levados a um banco de dados e, por comparação das massas, é feita a identificação (DMANDJA, 2004).

Figura 12 - Diagrama de CG x CG.



Descrição: Diagrama básico de um sistema CG x CG onde: (a) injetor, (b) coluna primária, (c) conectores de coluna, d) interface CGxCG, (e) coluna secundária, (f) detector e (g) divisão opcional para um forno secundário (extraído de Dmandja [2004])

No que se refere às dimensões das colunas utilizadas, a escolha mais comum para a primeira coluna capilar é a convencional apolar e longa de aproximadamente 30 m x 0,25 milímetros de espessura e película de 0,25-1,0 mM, na qual produz picos relativamente largos já que os compostos serão separados de acordo com sua volatilidade. Já a segunda coluna é geralmente constituída por material polar e são mais curtas de 1-2 m x 0,1 mm de diâmetro x 0,1 mm de espessura e película de micro - furo, aumentando assim a seletividade (PEDROSO *et al.*, 2009).

A cromatografia bidimensional (CG x CG) produz picos muito estreitos (abaixo de 50 ms, dependendo da frequência da modulação criogênica); deste modo, um detector TOF com uma elevada capacidade de aquisição de dados (até 500 espectros por segundo) é

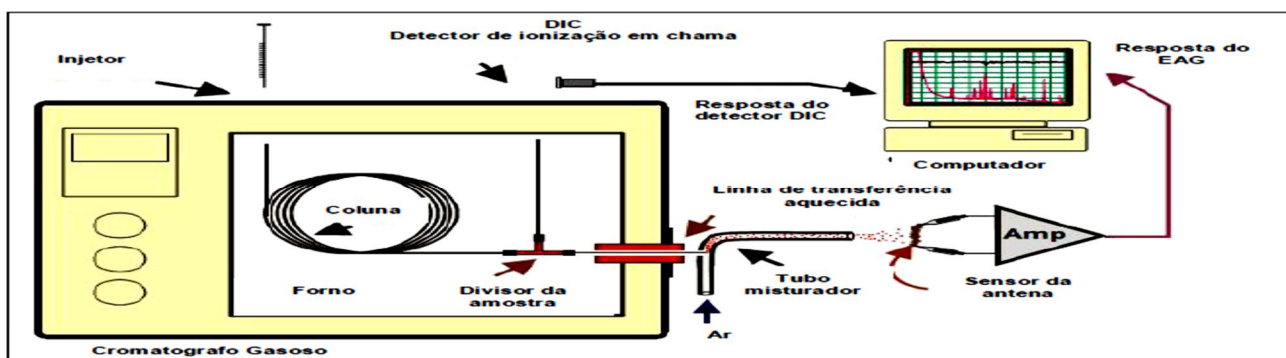
imprescindível. A natureza pulsante da fonte de ionização do TOF-EM reforça o sistema de precisão, evitando o desvio espectral comum em um modo contínuo de ionização. Assim, o CG x CG com detecção TOF-EM funciona com uma elevada precisão independentemente do intervalo de concentração (DMANDJA, 2004).

2.7.3. Cromatografia gasosa acoplada a detector eletroantenográfico (CG-EAG)

A técnica da cromatografia gasosa acoplada ao detector eletroantenográfico (CG-EAG) foi primeiramente relatada por Moorhouse et al., (1969) como sendo um método extremamente eficaz para a detecção de feromônios, uma vez que estaria aliada a especificidade e sensibilidade do EAG a enorme capacidade analítica e separação do cromatógrafo. Utilizando-se esta nova tecnologia, por meio de uma simples análise do extrato bruto, pode-se determinar com total precisão, qual composto é o feromônio. O esquema de um cromatógrafo a gás acoplado a um detector eletroantenográfico (CG-EAG) e um dado cromatograma, estão descritos na **Figuras 13 e 14**, respectivamente.

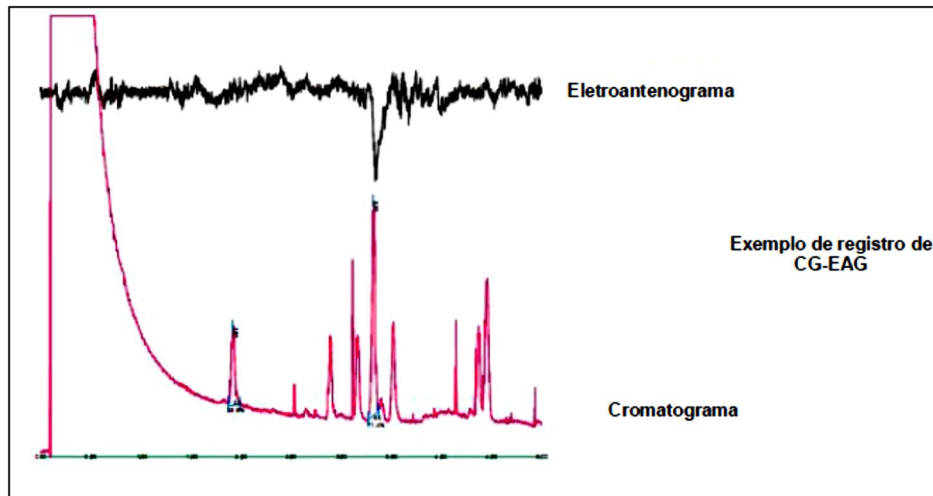
A amostra ao ser injetada irá percorrer toda a coluna para que haja a separação dos compostos. Ao final da corrida, o fluxo que está saindo da coluna é dividido (split) em dois, sendo que uma parte vai para o DIC (Detector de ionização de Chamas) onde o cromatograma é registrado e a outra parte vai para o EAG, onde a resposta da antena é amplificada. Em função de ambas as detecções serem simultâneas, é possível saber se o composto registrado pelo DIC é ou não ativo (ZARBIN, 2001).

Figura 13 - Esquema de um CG-EAG



Fonte: Adaptado de SYNTECH [2004]

Figura 14 - Cromatograma obtido de uma análise por CG-EAG.



Fonte: Adaptado de SYNTECH [2004]

REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. Informa economics/FNP. São Paulo, Brasil, p. 307, 2012.

AGUIAR, W. M. M., NASCIMENTO, A. S. Análise dos custos do programa de controle das moscas-das-frutas na cultura da manga no polo frutícola do Vale do Rio Brumado, BA. **Revista Bahia Agrícola**, v.9, n.1, p. 84-93, 2011.

ALBERTI, A. C. *et al.* Analysis of the genetic structure of a natural population of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 92, n. 5, p. 731–736, 1999.

ALBERTI, A. C. *et al.* Evidence indicating that the Argentine populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) belong to a single biological species. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 95, p. 505–512, 2002.

ALUJA M. *et al.* Behavior of flies in the genus *Anastrepha* (Trypetinae: Toxotrypanini). In: M., Aluja; Norrbom, A. D. L. (Org.). **Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior**. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 375–657, 2000.

AMARAL P. M. **Estudo da variabilidade isozímica de sete locos em larvas de populações naturais de *Anastrepha* (Díptera: Tephritidae)**. Tese de Doutorado, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 74 p, 1994.

ASBRAER. Associação Brasileira das Entidades Estaduais de Assistência Técnica e Extensão Rural. **Moscas causam estragos aos frutos**. 2012. Disponível em: <<http://www.asbraer.org.br/noticias,moscas-causam-estragos-aos-frutos,48713,154>>. Acesso em: 5 de Novembro de 2013 as 22:11 h.

BAKER, A. C.; STONE, W. E.; PLUMMER, C. C.; MACPHAIL, H. A review of studies on the mexican fruit fly and related mexican species. **NIST Special Publication**, v. 531, p. 1-155, 1944.

BARR, N. B.; CUI, L.; MCPHERON, B. A.; Molecular systematics of nuclear gene period in genus *Anastrepha* (Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**. v. 98, n. 2, p. 173-180, 2005.

BASSO, A. *et al.* Karyotypic and molecular identification of laboratory stocks of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wiedman) (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 96, n. 4, p. 1237-1244, 2003.

BECHARA, I. J.; DESTÉFANO, R. H. R.; BRESIL, C.; MESSIAS, C. L. Histopathological events and detection of *Metarhizium anisopliae* using specific primers in infected immature stages of the fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos - SP v.71, n.1, p.91-98. 2011.

BICKFORD, D. *et al.* Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in ecology and evolution**, v. 22, n. 3, p.148-155, 2007.

BIOCONTROLE, 2013. **Métodos de Controle de Pragas. *Anastrepha* spp.** Disponível em: <<http://www.biocontrole.com.br/?area=pragas&id=1>>. Acesso em: 05 Nov. 2013.

BLOUÍN, M. S. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 5, p.527-531, 2002.

BRAGA-SOBRINHO, R. *et al.* **Manual operacional para levantamento, detecção, monitoramento e controle de moscas-das-frutas.** Fortaleza – CE: Embrapa Agroindústria Tropical, p. 29, 2001.

BRANCO, E. S.; VENDRAMIM, J. D.; DENARDI, F. Resistência às moscas-das-frutas em fruteiras. In: Malavasi, A.; ZUCCHI, R. A. (ed.). **Moscas-das-frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto - SP, Holos, p.161-167, 2000.

BUSH, G. L. The cytotaxonomy of the larvae of some Mexican fruit flies in the genus *Anastrepha* (Tephritidae: Diptera). **Psyche**, v. 6, p. 87-101, 1962.

CÁCERES, C. *et al.* Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology. **Journal of Biological Linnean Society**, v. 97, p. 152–165, 2009.

CANAL DAZA, N. A. Braconídeos parasitoides de moscas-das-frutas na América do Sul. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, Foz de Iguaçu: Foz de Iguaçu, SEB. V. 5, p. 89-92, 1996.

CARVALHO, R. S.; NASCIMENTO, A. S.; MATRANGOLO, W. J. R. Controle biológico. In: Malavasi, A.; Zucchi, R. A. (ed.). **Moscas-das-frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto - SP, Holos, p. 113-117 2000.

CENDRA, P. V. G. **Estudios genéticos y comportamentales sobre la mosca sudamericana de la fruta (*Anastrepha fraterculus*)**. PhD dissertation, Universidad de Buenos Aires, 2007. 162p.

CORRÊA, A. G.; SANT'ANA, J. Fundamentos da comunicação química de insetos In: FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos: EdUFSCAR, Série de textos da escola de verão em química, vol. III., p. 9-22, 2001.

CUNHA, M. M. *et al.* **Manga para exportação: aspectos fitossanitários**. Brasília: MAARA-SDR-FRUPEX / Embrapa-SPI, 1993. (FRUPEX. Publicações Técnicas, 13). 104p.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: Um breve ensaio. **Química Nova na Escola** , n. 7, p. 21-25, 1998.

DMANDJA, J. M. D. GCXGC-Comprehensive 2-D GC provides high-performance separations in terms of selectivity, sensitivity, speed, and structure. **Analytical Chemistry**, v. 167A, p.76, 2004.

DUARTE, A. L.; MALAVASI, A. Tratamentos quarentenários In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas das frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, p. 187-192, 2000.

FAO/IAEA. South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wied) worldwide distribution. 2000. Disponível em <http://ecoport.org/ep?SearchType=pdb&PdbID=7412>. Acesso em: 10 jan. 2014.

FIELD SA; KASPI R; YUVAL B. Why do calling medflies (Diptera: Tephritidae) cluster? Assessing the empirical evidence for models of medfly lek evolution. **Florida Entomologist**, v. 85, p. 63–72, 2002.

FIGUEIREDO, J. V. A. *et al.* External eggshell morphology of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Acta Zoologica**, v. 00, p. 1-9, 2011.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. D.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. G.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Manual de Entomologia Agrícola**. São Paulo - SP: Agronômica Ceres, p.531, 2002.

GODAY, C. *et al.* Cytological characterization of sex chromosomes and ribosomal DNA location in *Anastrepha* species (Diptera, Tephritidae). **Cytogenetic and Genome Research**. **Basel**, v. 114, p. 70-76, 2006.

GOULD, W. P.; SHARP, J. L. Cold-storage quarantine treatment for carambolas infested with the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 83, n. 2, p. 458-460, 1990.

HERNÁNDEZ-ORTIZ, V., CANAL, N. A. TRIGRERO, J. Morphometrics of wild populations from Ecuador and Colombia of the *Anastrepha fraterculus* complex: The eighth passenger. In: **3rd Workshop of Resolution of Cryptic Species Complexes of Tephritid Pests to Overcome Constraints to SIT Application and International Trade; FAO/IAEA**, Tucumán, Argentina, 2013.

HERNÁNDEZ-ORTIZ, V.; *et al.* Cryptic Species of the *Anastrepha fraterculus* Complex (Diptera: Tephritidae): A Multivariate Approach for the Recognition of South American Morphotypes. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 105, n. 2, p. 305-318, 2012.

HERNÁNDEZ-ORTIZ, V. *et al.* Morphometric analysis of Mexican and South American populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera:Tephritidae) and recognition of a distinct Mexican morphotype. **Bulletin of Entomological Research**, v. 94, p. 487-499, 2004.

KLATAU, M. *et al.* Does cosmopolitanism result from overconservative systematics? A case study using the marine sponge *Chondrilla nucula*. **Evolution**, v. 53, n. 5, p. 1414-1422, 1999.

LANDOLT, P. J. Sex attractant and aggregation pheromones of male phytophagous insects. **American Entomology**, v. 43, p. 12-22, 1997.

LANDOLT, P. J.; AVERILL. A. L. Fruit flies. In: Hardie, J.; Minks, A. K. (Org.). **Pheromones of non-lepidopteran insects associated agricultural plants**. Portland, CABI Publishing, p. 466, 1999.

LANDRY, C. *et al.* Recent speciation in the Indo-west Pacific: rapid evolution of gamete recognition and sperm morphology in cryptic species of sea urchin. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 270, n.1526, p.1839-1847, 2003.

LIMA, I. S.; HOWSE, P.E. Diurnal Activity and Sexual Maturation of the South American Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) in the Laboratory. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 2, p. 299-308, 1997. ,

MALAVASI A, MORGANTE JS, PROKOPY RJ. Distribution and activities of *Anastrepha fraterculus* flies on host and non-host trees in nature. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 76, p. 286-741, 1983.

MALAVASI, A. Biologia, ciclo de vida, relação com o hospedeiro, espécies importantes e biogeografia de tefritídeos In: MALAVASI, A.; VIRGINIO, J. (Org.). **Biologia, monitoramento e controle: V Curso Internacional de Capacitação em Moscas-das-Frutas**. Juazeiro, Bahia, 2009.

MALAVASI, A.; BARROS, M. D. Comportamento sexual e de oviposição em moscas-das-frutas (Tephritidae). In: **ENCONTRO SOBRE MOSCAS-DAS-FRUTAS**, Campinas: Fundação Cargill, v. 1, p. 25-53, 1988.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A.; SUGAYAMA, R. L. Biogeografia In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas das frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, p. 93-98, 2000.

MAYR, E. **What evolution is**. New York : Basic books, p.381, 2001.

MCPHERON, B. A. *et al.* Phylogeny of genus *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based upon 16S rDNA mitochondrial sequences. In: ALUJA, M.; NORRBOM, A. L. (Org.), **Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior**, CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 343-361, 1999.

MENDES, L. O. T. Observações citológicas em “moscas-das-frutas”. **Bragantia**, v. 17, p. 29-39, 1958.

MOORHOUSE, J.E. *et al.* Method for Use in Studies of Insect Chemical Communication. **Nature**, v. 223, p. 1174–1175, 1969.

MORGANTE, J. S.; MALAVASI, A.; BUSH, G. L. Biochemical systematics and evolutionary relationships of neotropical *Anastrepha*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 73, p. 622-30, 1980.

MORGANTE, J. S. *et al.* Evolutionary patterns in specialist and generalist species of *Anastrepha*. In: ALUJA, M.; LIEDO, P. (Org.). **Fruit Flies: biology and management**. Springer, New York. Proceedings of the 3th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, 1993.

MORGANTE, J. S. **Moscas-da-frutas (Tephritidae): características biológicas, detecção e controle**. Boletim Técnico de Recomendações para os Perímetros Irrigados do Vale de São Francisco 2, Brasília, 19p, 1991.

NASCIMENTO, A. S. *et al.* Hot-water imersion treatment for mangoes infested with *Anastrepha fraterculus*, *A. obliqua* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, n. 2, p. 456-460, 1992.

NASCIMENTO, A. S.; CARVALHO R. S. Manejo integrado de moscas-das-frutas. In: Malavasi, A.; Zucchi, R. A. (ed.). **Moscas-das-frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto - SP, Holos, p.169-173, 2000.

NASCIMENTO, R. R.; A. E. G. SANT'ANA. Isolamento e identificação dos semioquímicos de insetos sociais. In: Vilela, E. F.; T. M. C. Della Lúcia, (Org.). **Feromônios de Insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas**, Ribeirão Preto, SP: Holos Editora, 206 p. 2001.

NATION, J. L. The role of pheromones in the mating system of *Anastrepha* fruit flies, In: Robinson, A. S.; Hooper, G. (Org.). **Fruit flies, their biology, natural enemies and control**. Elsevier, NY, v. 3A, p. 189-205, 1989.

NAVA, D. E.; BOTTON, M. **Bioecologia e Controle de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* em Pessegueiro**. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. Documentos, 315, 29p, 2010.

PEDROSO; M. P. *et al.* Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC x GC). **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 421-430, 2009.

PREZOTTO, L. F. Análise do ITS1 do DNA ribossômico em espécies do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae). Dissertação Mestrado, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 66p., 2008.

RIDLEY, M. **Evolution**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, 752p.

SALLES, L. A. B.; KOVALESKI, A. Mosca-das-frutas em macieira e pessegueiro no Rio Grande do Sul. **Hortisul**, v.1, p. 5-9, 1990.

SALLES, L. A. Biologia e ciclo de vida de *Anastrepha farterculus* In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. **Moscas das frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, p. 81-86, 2000.

SANTOS, J.C.G.S. Estudo da preferência alimentar de machos de *Anastrepha* spp. e dos constituintes voláteis liberados por estes machos e por seu hospedeiro principal, *Psidium guajava* L. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Alagoas, 70p, 2003.

SANTOS, P. **Variabilidade do DNA mitocondrial em populações de três espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae)**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 312p, 1994.

SEBRAE. Serviço de Brasileiro de apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Estatística das Exportações e Importações de Frutas Frescas**. p. 66, 2013.

SEGURA D. *et al.* Lekking behavior of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, v. 90, 154–162, 2007.

SELIVON, D. *et al.* Extrusion of masses of yolk during embryony development of the fruit fly *Anastrepha fraterculus*. *Invertebrate Reproduction and Development*, **Rehovot**, v. 29, p. 1-7, 1996.

SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P. Eggshell morphology in two cryptic species of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 91, p. 473-478, 1998.

SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P.; MORGANTE, J. S. Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 507–510, 1999.

SELIVON, D. *et al.* Caracterização de regiões heterocromáticas dos cromossomos mitóticos e do DNA ribossômico de espécies de *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae). **50º Congresso Nacional de Genética**, Florianópolis, 2004a.

SELIVON, D. *et al.* New variant forms in the *Anastrepha fraterculus* complex. **Proc. 6th International Fruit Flies**. In: B. Barnes (ed.), Isteg Scientific Publications, Irene, South Africa, p. 253-258, 2004b.

SELIVON, D., PERONDINI, A. L. P.; MORGANTE, J. S. A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, n. 3, p. 367-381, 2005.

SILVA, R.A.; LEMOS, W.P.; ZUCCHI, R.A. **Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira diversidade, hospedeiros e inimigos naturais**. Macapá: EMBRAPA, p. 55, 2011.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. Pioneira, São Paulo. 2006.

SMITH-CALDAS, M. R. B. *et al.* Phylogenetic relationships among species of the *fraterculus* group (*Anastrepha*: Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I. **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 565-573, 2001.

SOLFERINI, V. N.; MORGANTE, J. S. Karyotype study of eight species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). **Caryologia florence**, v. 40, p. 229-41, 1987.

STECK, G. J. Biochemical systematics and population genetic structure of *Anastrepha fraterculus* and related species (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 84, p. 10-28, 1991.

STECK, G. J.; SHEPPARD, W. S. Mitochondrial DNA variation in *Anastrepha fraterculus*. In: ALUJA, M.; LIEDO, P. (Org.). **Fruit flies biology and management..** Springer New York, p. 9-14, 1993.

STONE, A. **The fruit flies of the genus *Anastrepha***. U.S. Department Of Agriculture, Miscellaneous Publication. Washington DC, n. 439, p. 1-112, 1942.

SYNTECH. **ELECTROANTENNOGRAPHY: A practical introduction**. Hilversum, The Netherlands. P. 13, 2004.

TOLEDO, J.; ROJAS, R.; BARRA, J. E. I. Efficiency of *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae) on *Anastrepha serpentina* (Diptera: Tephritidae) larvae under laboratory conditions. **Florida Entomologist**, Florida, v. 89, n. 4, p. 524-526. 2006.

VERA, M. T. *et al.* Mating Incompatibility Among Populations of the South American Fruit Fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 99, n. 2, p. 387-397, 2006.

ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA, J. T. B.; LEAL, W. S. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Química Nova**, v.22, n. 2, p. 263-268, 1999.

ZARBIN, P. H. G. Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos. In: Vilela E. F., Della-Lucia, M. C. (Org.). **Feromônios de Insetos: Biologia, Química e Emprego no Manejo de Pragas**. 2ª ed. Holos, Ribeirão Preto, Brasil, p. 45–5, 2001.

ZUCCHI, R.A. 2008. **Anastrepha species and their hosts plants. Fruit flies in Brazil**. Disponível em: <http://www.lef.esalq.usp.br/anastrepha/edita_infos.htm>. Acesso em: 15 Fev. 2014.

ZUCCHI, R. A. Diversidad, distribución y hospederos del género *Anastrepha* em Brasil. In: HERNÁNDEZ-ORTIZ, V. (Org.) **Moscas de la fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): Diversidad, biología y manejo**. México, S & G, p. 77-100, 2007.

ZUCCHI, R. A. Taxonomia In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas das frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, p. 13-24, 2000a.

ZUCCHI, R.A. Espécies de *Anastrepha*, sinomínias, plantas hospedeiras e parasitoides. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, p.41-48, 2000b.

CAPÍTULO 1

SEMIOQUÍMICOS DE MOSCAS DAS FRUTAS DO GÊNERO *ANASTREPHA*

Quim. Nova, Vol. XY, No. 00, 1-9, 200_

SEMIOQUÍMICOS DE MOSCAS DAS FRUTAS DO GÊNERO *Anastrepha*

Alana Lima-Mendonça, Adriana de Lima Mendonça, Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana e Ruth R. Do Nascimento*
Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970 Maceió – AL, Brasil

Recebido em 14/02/2013; aceito em 05/09/2013; publicado na web em 16/10/2013

Revisão

ABSTRACT

Volatile compounds involved in the chemical communication of fruit flies have been studied for some years; however, their complete elucidation has not yet been reported. Tephritids, which belong to the *Anastrepha* genus, exhibit inter- and intraspecific changes regarding the chemical composition of their sex pheromones, as well as an evident relationship with the volatiles produced by their hosts. This paper reports advances in the elucidation of the chemical communication of *Anastrepha* species that involve sex pheromones, cuticular hydrocarbons, and the interaction between the fruit host volatiles and compounds released by the male flies.

Keywords: cryptic species; fruit flies; *Anastrepha*.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, perdendo apenas para a China e a Índia, ocupando o primeiro lugar em número de espécies de clima tropical. Ainda, nos últimos doze anos, as exportações de frutos frescos cresceram uma média de 2,5 toneladas/ ano, representando um montante superior a 900 milhões de dólares, ao passo que as frutas processadas representaram cerca de dois bilhões de dólares no agronegócio de frutas. No ano de 2011 foram exportadas 681.268 toneladas de frutos com uma previsão de mais de 750 mil toneladas para 2012.¹ Embora o mercado exportador de frutos brasileiros esteja em nítida expansão, alguns problemas surgem em decorrência do ataque de insetos-praga, destacando-se dentre eles as moscas-das-frutas, devido aos grandes prejuízos causados ao mercado interno por ocasionarem queda precoce e depreciação de frutos para consumo *in natura* e para a industrialização.²

Os danos diretos causados pelas moscas-das-frutas são representados pela punctura realizada pela fêmea, no momento da oviposição, e/ou pelo desenvolvimento da larva no interior do fruto. Dependendo da espécie frutífera, a punctura realizada durante a oviposição pode servir de porta de entrada para fungos e bactérias, como foi observado em macieira,³ podendo ocorrer também a queda prematura dos frutos, provocada por distúrbios hormonais, devido às larvas que se desenvolvem no seu interior.^{4,5}

De acordo com a FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura), mundialmente, os prejuízos causados por tefritídeos totalizam US\$ 1,7 bilhão por ano, 10% dos quais ocorrem no Brasil.⁶ Poucos insetos têm maior impacto no comércio internacional do que as moscas-das-frutas pertencentes à família Tephritidae. Tais moscas têm assumido crescente importância enquanto pragas de frutas e vegetais, gerando a implantação de sérios programas de controle regionais, nacionais e interfronteiras.⁷

A forma de controle para moscas-das-frutas mais amplamente usada no Brasil é a química, por meio de aplicações de iscas tóxicas e pulverizações em cobertura, empregando-se inseticidas fosforados, os quais possuem elevada toxicidade e carência, além de não serem seletivos aos inimigos naturais.^{8,9} Com a mudança no perfil do consumidor, particularmente os apreciadores de frutos *in natura*, que exigem alimentos com níveis reduzidos ou isentos de resíduos de agrotóxicos e da conscientização da população sobre os riscos ambientais causados por tais produtos, os programas de manejo integrado de pragas têm incentivado o

uso de vários métodos e táticas de controle destacando-se dentre eles o monitoramento dos pomares, o ensacamento dos frutos, a resistência varietal, o controle biológico e o uso de atrativos.¹⁰ O uso de semioquímicos, principalmente os feromônios, de insetos-praga aumenta a eficiência de estratégias de controle, tais como monitoramento, coleta em massa e confusão sexual, e ainda contribui para a preservação do meio ambiente.¹¹

Dentre os tefritídeos, aqueles pertencentes ao gênero *Anastrepha* Schiner contêm o maior número de espécies nos trópicos e subtropicais das Américas com mais de 250 descritas.¹²⁻¹⁶ Da mesma forma, é o gênero mais importante em nível de pragas nessas regiões.¹⁷ No mundo, as espécies estão distribuídas principalmente na América do Sul e em parte das Américas Central e do Norte-México, sul do Texas e centro-sul da Flórida.¹⁸ As de maior importância econômica são *A. obliqua* (Macquart), *A. ludens* (Loew), *A. suspensa* (Loew), *A. grandis* (Macquart), *A. serpentina* (Wiedemann), *A. striata* (Schiner).¹⁹ e *A. fraterculus* (Wiedemann) com destaque para esta última, conhecida como mosca das frutas sul-americana, a qual é altamente polífaga¹⁴ e apresenta uma ampla distribuição nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina.²⁰

Anastrepha fraterculus, originalmente considerada uma praga amplamente distribuída,^{18,21,22} é atualmente conhecida por constituir um complexo de espécies crípticas (denominado Complexo AF) que exhibe níveis consideráveis de isolamento reprodutivo pré- e pós-zigótico. Alguns estudos importantes realizados com diferentes populações desta espécie, inclusive brasileiras, demonstraram a existência de entidades taxonômicas distintas. Tais diferenças foram observadas em nível de filogenia (gene mitocondrial citocromo oxidase I - COI), citogenética (diferenciação cariótica), preferência do hospedeiro, isoenzimática, morfologia de ovos, desenvolvimento embrionário, morfometria e compatibilidade de acasalamento, além da comunicação química, neste caso somente para populações do Peru e Argentina.²³⁻³⁸

No Brasil, o estudo do complexo *fraterculus* é de especial interesse, porque estudos anteriores sugeriram a existência de três espécies neste complexo, as quais foram denominadas *Anastrepha fraterculus* sp.1 aff. *fraterculus*, *Anastrepha fraterculus* sp.2 aff. *fraterculus* e *Anastrepha fraterculus* sp.3 aff. *fraterculus*.^{28,33,35,39} Da mesma forma, o cruzamento de *Anastrepha fraterculus* sp. 1 aff. *fraterculus* com *Anastrepha fraterculus* sp.2 aff. *fraterculus*, resultou na diminuição do período de incubação de ovos e no desvio da

proporção sexual, indicando a existência de isolamento reprodutivo.^{29,35} Esse alto nível de isolamento pré-zigótico é baseado nas diferenças no ritmo da atividade sexual e, provavelmente, na composição do feromônio sexual do macho.^{40,41}

Os insetos exercem as relações ecológicas envolvidas na sua comunicação com o ambiente e com os outros organismos de várias maneiras, sendo uma das mais importantes aquela que é mediada por compostos químicos. Esses compostos, denominados sinais químicos ou semioquímicos é, provavelmente, a mais antiga forma de comunicação em organismos vivos, e os insetos constituem um grupo de animais que utilizam e dependem destes compostos em diversas etapas do seu comportamento reprodutivo e de sobrevivência no habitat em que estão inseridas. Os sinais químicos utilizados pelos insetos são divididos em dois grupos: os aleloquímicos e os feromônios. Os aleloquímicos compreendem as substâncias envolvidas na comunicação interespecífica e atuam no processo de busca pelo alimento, tais compostos podem agir como alomônios, cairomônios e sinomônios, dependendo do organismo que emite e recebe os sinais. Quando o semioquímico tem ação intraespecífica é chamado de feromônio e se é liberado pelo macho ou pela fêmea e atrai o sexo oposto é conhecido como feromônio sexual.⁴²⁻⁴⁴ Esses sinais são percebidos por células nervosas receptoras localizadas dentro das sensilas olfativas,⁴⁵ as quais estão presentes principalmente nas antenas, podendo, também, estarem localizadas nas mandíbulas, palpos, tarsos e no ovipositor.⁴⁶⁻⁴⁸

Nas espécies do gênero *Anastrepha* a liberação dos atraentes sexuais é feita pela distensão lateral da cutícula abdominal na altura do terceiro ao quinto segmentos, formando bolsas que estão associadas às glândulas exócrinas pleurais. Além dessa via, as substâncias atraentes são também oriundas de secreções intestinais, as quais são liberadas no momento em que o tecido anal é evertido, apresentando uma gótícula de secreção na extremidade do abdome e pela extensão e retração das partes bucais, que estão associadas às glândulas salivares.⁴⁹⁻⁵¹

Feromônio de agregação

A comunicação é um processo crucial para ambas as interações intra e interespecífica de todos os organismos.⁵² Em tefritídeos como *Anastrepha* spp., os machos produzem feromônios para atrair machos e fêmeas coespecíficas para os *leks* (assembléias de machos).

Por funcionar como atraente para ambos os sexos, este sinal químico é classificado como feromônio de agregação. Entretanto, pelo fato de funcionar como atraente para fêmeas, este sinal também pode ser classificado como feromônio sexual. A resposta comportamental de um inseto estimulado pelo feromônio de agregação é o movimento em direção à fonte feromonal. Além disso, na maioria das vezes, a agregação de ambos os sexos ocorre em associação com os locais de oviposição, alimentação ou ainda com a exibição de comportamento agressivo relacionado à defesa de território.⁵³

Os tefritídeos, por exemplo, utilizam pistas olfativas para buscar e avaliar o habitat, as fontes de alimento e os sítios de oviposição.⁵⁴⁻⁵⁶ Sendo assim, os sinais químicos têm sido estudados a partir de duas diferentes perspectivas: i) a forma como as moscas armazenam e liberam os feromônios sexuais⁵⁷ e ii) como estes infoquímicos são empregados na atração de fêmeas e influenciam no sucesso do acasalamento.^{49,58}

Os feromônios sexuais desempenham papel fundamental no reconhecimento de parceiro e no comportamento de acasalamento de espécies pertencentes ao gênero *Anastrepha*. Nas espécies deste gênero, um macho pioneiro escolhe um determinado sítio e inicia o comportamento de chamamento e corte, emitindo sinais químicos que atraem outros machos para o mesmo local, os quais também passam a exibir um comportamento coletivo que envolve movimentos estereotipados e a liberação simultânea de sinais químicos, acústicos e visuais, para atrair fêmeas sexualmente receptivas, as quais, após interagirem com alguns machos do grupo, escolhem um deles para copular.^{59,60}

As áreas de exibição onde os machos se congregam para atrair e cortejar as fêmeas são denominadas de assembleias de machos ou *leks* e já foram observadas em algumas espécies do gênero *Anastrepha*.^{50,61} Vários tefritídeos formam *leks* nas folhagens das árvores hospedeiras ou não, próximas aos sítios de oviposição das fêmeas, que são atraídas para os *leks* objetivando exclusivamente a cômte e a seleção do parceiro.⁶⁰

Anastrepha spp. obedece a um padrão pouco variável na sequência comportamental, as mudanças ocorrem basicamente em relação ao período do dia e fatores como idade e status de acasalamento. Após atingirem a maturidade sexual, na fase adulta, os machos exibem o comportamento de chamamento, apresentando uma distensão das bolsas abdominais e da bolsa anal e mantém as asas em ângulo reto ao corpo, vibrando-as periodicamente em alta frequência por um período de 1 a 3 segundos. Em adição aos sons produzidos, os quais possivelmente fazem parte do processo de comunicação, a vibração de asas ajuda na

dispersão dos atraentes sexuais, uma vez que direciona um jato de ar sobre as referidas bolsas, além de elevar a temperatura do corpo como resultado do trabalho metabólico realizado. Frequentemente, após um período de vibração de asas, o inseto toca a superfície da folha com a extremidade do abdome, provavelmente depositando pequenas quantidades de atraente sexual e, em seguida, gira o corpo em outra direção e repete a vibração de asas e o toque sobre a superfície da folha com a extremidade do abdome.⁵¹ Alguns componentes do feromônio sexual já foram identificados em espécies do gênero *Anastrepha* (Tabela 1).

Anastrepha suspensa

Para *A. suspensa*, nove compostos incluindo dois álcoois: (*Z*)-3-nonenol e (*Z, Z*)-3,6-nonadienol,⁶² três lactonas isoméricas: anastrefina (*trans*-hexaidro-*trans*-4,7 α -dimetil-4-vinil-2-(3H)-benzofuranona), epianastrefina (*trans*-hexaidro-*cis*-4,7 α -dimetil-4-vinil-2-(3H)-benzofuranona) e suspensolídeo (*E, E*)-4,8-dimetil-3,8-decadien-10-olídeo);^{63,64} três sesquiterpenos: β -bisaboleno, *E, E*- α -farneseno e α -*trans*-bergamoteno e um monoterpreno: (*Z*)- β -ocimeno,⁶⁵⁻⁶⁷ foram identificados como os compostos voláteis presentes na mistura liberada por machos e que funciona como atraente para as fêmeas. As fontes de emissão destes compostos são principalmente a cavidade pré-oral e a bolsa anal do macho, entretanto, a liberação de alguns destes constituintes voláteis através de poros presentes na cutícula não pode ser descartada.^{40,42}

Existem dois aspectos interessantes no comportamento de sinalização sexual de machos de *A. suspensa*: o primeiro é que, durante a liberação de feromônios, os machos tocam a face da folha com um material proveniente da glândula anal e segundo, eles regurgitam, através da cavidade pré-oral, gotas de líquido sobre as superfícies foliares. Existe um pico de inclinação da glândula feromonal anal no começo do fotoperíodo, seguido por um declínio e, então, mais um período extensivo de atividade na segunda metade do fotoperíodo. Durante os períodos de picos de sinalização, a maioria dos machos tem uma série distinta de glândulas laterais projetadas para frente na maior parte do tempo. Episódios de agitação de asas (os quais podem dispersar o feromônio) também são observados e a inclinação de abdômen coincide com o período de ocupação do macho na superfície da folha. Por sua vez, as fêmeas são atraídas até 48 horas após a deposição e, além disso, esse comportamento

também foi observado em machos no momento em que estão formando as assembleias ou *leks*, objetivando criar um sistema em que a volatilização do feromônio é lenta.⁶⁸

Inicialmente, foi sugerido que as lactonas isoméricas anastrefina e epianastrefina poderiam funcionar como odores de atração, para fêmeas desta espécie, quando misturados à secreção oral.⁵¹ Posteriormente, análises químicas de extratos da secreção oral de machos sexualmente maduros revelaram que além das duas lactonas acima mencionadas existem mais três compostos: outra lactona, o suspensólideo e dois sesquiterpenos: β -bisaboleno e (*E,E*)- α -farneseno, os quais também estão presentes, em grandes quantidades, na mistura de compostos liberada por machos de *A. suspensa* durante a sinalização sexual.⁶⁹

Anastrepha ludens

A mistura feromonal produzida ou emitida por machos de *A. ludens* é quimicamente muito semelhante àquela produzida por machos de *A. suspensa*.⁶⁷

Os estudos conduzidos até hoje reportaram que as duas espécies diferiram marcadamente com relação à mistura de terpenos liberada, em particular quanto às proporções relativas dos sesquiterpenos. A mistura de compostos liberada por machos de *A. suspensa* continha o sesquiterpeno cíclico β -bisaboleno, como o componente mais abundante, uma menor quantidade de (*E,E*)- α -farneseno e traços de *a-trans*-bergamoteno. Por outro lado, a mistura de compostos voláteis liberados por machos de *A. ludens* apresentava o sesquiterpeno acíclico (*E,E*)- α -farneseno, como o componente presente em maior proporção, uma menor quantidade de *a-trans*-bergamoteno e uma quantidade mínima de β -bisaboleno. Essas duas espécies também diferiram com relação aos monoterpenos presentes na mistura de compostos voláteis liberada pelos machos. *A. suspensa* liberou exclusivamente o monoterpeno acíclico (*Z*)- β -ocimeno, enquanto *A. ludens* emitiu somente o isômero cíclico deste, o limoneno. Os autores relacionaram as diferenças encontradas nos terpenos de *A. suspensa* e *A. ludens* ao isolamento reprodutivo destas duas espécies.⁶⁷ Sendo assim, as diferenças quantitativas e qualitativas da composição feromonal garantem a especificidade da comunicação química entre as duas espécies.

Anastrepha obliqua

Em *A. obliqua*, os primeiros estudos relatando a composição do feromônio sexual de machos foram realizados há dez anos. No primeiro estudo com esta espécie, dois compostos, (*Z,E*)-a-farneseno e (*E,E*)-a-farneseno, foram identificados como os compostos voláteis majoritários presentes na mistura liberada por machos. Além destes terpenóides, o álcool (*Z*)-3-nonenol foi também identificado, sendo que os dois primeiros foram isolados de extratos das glândulas salivares e o último do intestino posterior de machos desta espécie. Além disso, outros compostos, tais como: (*Z,Z*)-3,6-nonadienol, b-bisaboleno, suspensolídeo, anastrefina e apianastrefina, que foram identificados como componentes da mistura de compostos liberados por machos de *A. suspensa* e *A. ludens*, não foram detectados na mistura produzida por machos de *A. obliqua*.^{70,71} Em um segundo estudo, conduzido em 2004,⁷² foi demonstrado que a mistura de compostos liberada por machos desta espécie é caracterizada pela presença predominante do 1-heptanol. Esse álcool não havia sido identificado em nenhuma das espécies do gênero *Anastrepha* estudadas até então. Entretanto, nenhuma das lactonas identificadas na mistura feromonal de machos de *A. suspensa* e *A. ludens* foi detectada na mistura de compostos voláteis liberada por machos de *A. obliqua*. Por outro lado, compostos oxigenados, tais como: (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol, 2-hexanona, hexanoato de etila e os terpenóides: linalol, a-*trans*-bergamoteno, α-*trans*-cariofileno e a-copaeno foram caracterizados como constituintes da mistura de compostos liberada por machos de *A. obliqua*. Recentemente, foram identificados nove compostos liberados por machos desta espécie, pertencentes a populações de laboratório, a saber: (*Z*)-3-nonenol, nonadienol, um sesquiterpeno de identidade desconhecida, b-farneseno, (*E,E*)-a-farneseno, (*Z,E*)-a-farneseno e três isômeros do farneseno. Dentre estes compostos, (*Z*)-3-nonenol e a mistura constituída por (*Z*)-3-nonenol+b-farneseno foram atrativos para fêmeas e machos de *A. obliqua*.⁷³ Apesar disto, a identificação completa e a síntese dos compostos desconhecidos precisam ser realizadas, para avaliação de suas atividades biológicas em ensaios comportamentais.

Anastrepha striata

Para *A. striata* foi demonstrado que os principais compostos presentes na mistura liberada por machos desta espécie foram: linalool, hexanoato de etila e octanoato de etila.⁷⁰ No entanto, a atividade feromonal destes compostos ainda não foi estabelecida.

Anastrepha serpentina

Recentemente, o feromônio de *A. serpentina* foi isolado e identificado e os dois componentes majoritários do feromônio emitido por machos foram a 2,5-dimetilpirazina (DMP) e o 3,6-diidro-2,5-dimetilpirazina (DHDMP), além da 2,3,5-trimetilpirazina (TMP) como componente minoritário.⁷⁴ Bioensaios subsequentes, nos quais foram testadas misturas contendo DMP, TMP e DHDMP, aplicadas em papel filtro e expostas a fêmeas de *A. serpentina*, revelaram que a mistura constituída por DMP e DHDMP apresenta maior probabilidade de constituir o feromônio sexual para esta espécie.⁷⁵

Anastrepha fraterculus

Os componentes voláteis liberados por machos de *A. fraterculus* foram primeiramente isolados das glândulas salivares de espécimes provenientes da região sul do Brasil.⁷⁶ No extrato dessas glândulas foram identificados os sesquiterpenos isoméricos (*E,Z*)-*a*-farneseno e (*Z,E*)-*a*-farneseno, e a lactona (*E,E*)-suspensolídeo. A análise química da secreção dessa glândula revelou a presença de (*E,Z*)-*a*-farneseno como o composto mais abundante, do (*Z,E*)-*a*-farneseno e de quatro pirazinas: 2,5-dimetilpirazina (DMP), 2,3,5-trimetilpirazina (TMP), 3-etil-2,5-dimetilpirazina (EDMP) e a 3-butil-2,5-dimetilpirazina, em quantidades muito pequenas. Posteriormente, para essa mesma população, foram identificados na mistura de compostos voláteis liberados por machos dois monoterpênicos: o (*Z*)-*b*-ocimeno e o limoneno. O primeiro em maior quantidade do que o segundo. No extrato de lavagem da câmara onde os machos foram acondicionados para coleta dos compostos voláteis, foram identificadas as lactonas anastrefina e epianastrefina, como componentes menos abundantes que o (*E,Z*)-*a*-farneseno.⁷⁷ Um estudo químico da mistura de constituintes voláteis liberada por machos em chamamento de população de *A. fraterculus*, coletada no município de Paripueira (Alagoas), região nordeste do Brasil, revelou a presença de 23 compostos, dos quais merecem destaque o (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol, o *a-trans*-bergamonteno, o α -*trans*-cariofileno, o (*E,E*)- α -farneseno e o *b*-bisaboleno. Além desses compostos, as lactonas isoméricas suspensolídeo, anastrefina e epianastrefina, também foram identificadas.⁷⁸

Considerando a hipótese de que diferenças fisiológicas e morfológicas evidentes ou sutis podem influenciar na composição química do feromônio sexual de populações diferentes desta espécie, visto que os mesmos atuam no contexto intraespecífico, estudos recentes

identificaram diferenças qualitativas e quantitativas na composição química do feromônio de machos de *A. fraterculus* oriundos de populações provenientes da Argentina e do Peru.⁴⁰ Os autores afirmaram que machos da primeira população produzem pequenas quantidades de (*E*)-*b*-ocimeno, *n*-nonanal e grandes quantidades de (*Z*)-3-nonen-1-ol, ácido benzóico, suspensolídeo, (*Z,E*)-*a*-farneseno, (*E,E*)-*a*-farneseno, anastrefina e epianastrefina e nenhuma quantidade detectável de (*E*)-*a-trans*-bergamoteno ou *b*-bisaboleno. Entretanto, machos da população proveniente do Peru produziram pequenas quantidades de limoneno, *n*-nonanal e (*Z*)-3-nonen-1-ol e quantidades relativamente grandes de (*E*)-*b*-ocimeno e (*E*)-*a-trans*-bergamoteno, (*E,E*)-*a*-farneseno e *b*-bisaboleno, suspensolídeo, anastrefina e epianastrefina, e, nenhuma quantidade detectável de (*Z,E*)-*a*-farneseno. Além disso, a mistura de compostos liberada por machos de populações híbridas (obtidas pelo cruzamento de machos e fêmeas de populações originárias da Argentina e do Peru) foram semelhantes tanto qualitativa quanto quantitativamente e continham todos os compostos identificados nas cepas parentais. Estudos de compatibilidade de acasalamento verificaram que fêmeas híbridas preferem acasalar com machos híbridos, sugerindo que tal resposta pode ser mediada por mudanças na resposta ao feromônio do macho, indicando possíveis diferenças nas misturas feromonais dos machos em relação aos parentais.⁴¹

Análises químicas e eletrofisiológicas de extratos contendo constituintes químicos da mistura feromonal liberada por machos de *A. fraterculus*, mantidos em laboratório e provenientes de população originária da Argentina, demonstraram que, dentre os compostos identificados, seis eliciaram respostas em antenas de fêmeas, são eles: (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*Z,Z*)-3,6-nonadien-1-ol, geranilacetona, (*E,E*)-3,6- α -farneseno, suspensolideo e (*S,S*)-(-)-epianastrefina. Essas análises também revelaram que as antenas de machos coespecíficos respondem a estes compostos, com exceção dos álcoois (*Z*)-3-nonen-1-ol e (*Z,Z*)-3,6-nonadien-1-ol.⁷⁹ Esses resultados sugerem a existência de uma especificidade sexual na percepção de componentes individuais do feromônio sexual desta espécie e, por conseguinte, levanta a hipótese de uma implicação de tais componentes como sinais carreadores de informações específicas em duas situações distintas: a do chamamento para a formação de *leks* e a que visa predominantemente a atração de fêmeas para a escolha de parceiro. No entanto, bioensaios específicos precisam ser conduzidos para confirmar ou refutar esta hipótese.

Tabela 1. Descrição dos compostos identificados na mistura feromonal de *Anastrepha* spp.

Compostos	Espécies
(Z)-3-nonenol	<i>A. suspensa</i> <i>A. ludens</i> <i>A. obliqua</i> <i>A. fraterculus</i>
(Z,Z)-3,6-nonadienol	<i>A. suspensa</i> <i>A. ludens</i> <i>A. fraterculus</i>
Anastrefina (<i>trans</i> -hexaidro- <i>trans</i> -4,7 α -dimetil-4-vinil-2-(3H)-benzofuranona)	<i>A. suspensa</i> <i>A. fraterculus</i>
Epianastrefina (<i>trans</i> -hexaidro- <i>cis</i> -4,7 α -dimetil-4-vinil-2-(3H)-benzofuranona)	<i>A. suspensa</i> <i>A. fraterculus</i>
Suspensolídeo (<i>E,E</i>)-4,8-dimetil-3,8-decadien-10-olídeo	<i>A. suspensa</i> <i>A. ludens</i> <i>A. fraterculus</i>
β -bisaboleno	<i>A. suspensa</i> <i>A. ludens</i> <i>A. fraterculus</i>
(<i>E,E</i>)- α -farneseno	<i>A. suspensa</i> <i>A. ludens</i> <i>A. obliqua</i> <i>A. fraterculus</i>
(Z)- β -ocimeno	<i>A. suspensa</i> <i>A. fraterculus</i>
α - <i>trans</i> -bergamoteno	<i>A. suspensa</i> <i>A. ludens</i> <i>A. obliqua</i>
(<i>S,S</i>)-(-)-epianastrefina	<i>A. ludens</i>
(<i>S,S</i>)-(-)-anastrefina	<i>A. ludens</i>
(<i>R,R</i>)-(+)-epianastrefina	<i>A. ludens</i>
Limoneno	<i>A. ludens</i> <i>A. fraterculus</i>
(Z, <i>E</i>)- α -farneseno	<i>A. obliqua</i> <i>A. fraterculus</i>
1-heptanol	<i>A. obliqua</i>
(<i>E,Z</i>)-3,6-nonadien-1-ol	<i>A. obliqua</i> <i>A. fraterculus</i>
Hexanoato de etila	<i>A. obliqua</i> <i>A. striata</i>
2-hexanona	<i>A. obliqua</i>
Linalol	<i>A. obliqua</i> <i>A. striata</i>
α - <i>trans</i> -cariofileno	<i>A. obliqua</i>
α -copaeno	<i>A. obliqua</i>

(<i>E,Z</i>)-3,6-Nonadienol	<i>A. obliqua</i>
β -farneseno	<i>A. obliqua</i>
Sesquiterpenos desconhecidos	<i>A. obliqua</i>
Isômeros do farneseno	<i>A. obliqua</i>
Octanoato de etila	<i>A. striata</i>
2,5-dimetilpirazina (DMP)	<i>A. serpentina</i> <i>A. fraterculus</i>
3,6-diidro-2,5-dimetilpirazina (DHDMP)	<i>A. serpentina</i> <i>A. fraterculus</i>
2,3,5-trimetilpirazina (TMP)	<i>A. serpentina</i> <i>A. fraterculus</i>
(<i>E,Z</i>)- α -farnezeno	<i>A. fraterculus</i>
3-butil-2,5-dimetil pirazina	<i>A. fraterculus</i>
(<i>E,Z</i>)-3,6-nonadien-1-ol	<i>A. fraterculus</i>
(<i>E</i>)- β -ocimeno	<i>A. fraterculus</i>
<i>n</i> -nonanal	<i>A. fraterculus</i>
Ácido benzoico	<i>A. fraterculus</i>
α - <i>trans</i> -bergamonteno	<i>A. fraterculus</i>
Geranilacetona	<i>A. fraterculus</i>
(<i>E,E</i>)-3,6- α -farneseno	<i>A. fraterculus</i>

Hidrocarbonetos cuticulares

Embora os atraentes de longa distância (feromônios sexuais) sejam imprescindíveis para o encontro entre parceiros, existem outras substâncias, como é o caso dos hidrocarbonetos e alguns compostos minoritários tais como ésteres, alcoóis e ácidos graxos livres, presentes na epicutícula do inseto, que podem funcionar como atraentes de curta distância, induzindo mudanças fisiológicas, tais como receptividade em fêmeas e outros comportamentos associados à cópula.⁸⁰⁻⁸²

A descoberta do papel que os hidrocarbonetos desempenham na comunicação química (servir como feromônio sexual, cairomônios, sinais de reconhecimento inter, intraespecífico e sexual, mimetismo químico e feromônios de efeito preparador) resultou em uma explosão de novas informações nas últimas décadas.⁸³ Hidrocarbonetos cuticulares de insetos (CHCs) são usualmente uma mistura de compostos que podem incluir *n*-alcanos, *n*-alcenos,

monometilalcanos com ramificação terminal, monometilalcanos com ramificação interna, dimetilalcanos, trimetilalcanos e outros. Eles são sintetizados a partir dos precursores acetil-CoA e malonil-CoA, a partir da descarboxilação nos oenocitos, os quais estão associados com as células epidérmicas ou corpos gordurosos. Após a síntese, os CHCs são transportados através da hemolinfa pela proteína lipoforina.^{82,84} Um esquema descritivo da síntese destes hidrocarbonetos pode ser visualizado na Figura 1. O perfil de hidrocarbonetos cuticulares, os quais são espécie-específicos tanto em insetos solitários como sociais, servem como impressões digitais, tornando possível discriminar espécies taxonomicamente semelhantes.⁸⁵

Diferenças qualitativas e/ou quantitativas especificamente relacionadas ao sexo e ao *status* de acasalamento têm sido demonstradas para uma extensa lista de insetos incluindo os dípteros.⁸⁰ Estudos realizados com tefritídeos demonstraram que os CHCs constituem um sinal potencial para o reconhecimento de espécies e de parceiros. A investigação de mudanças no perfil de CHCs dependentes da idade e do sexo do inseto pode revelar importantes informações para escolha entre parceiros, isto é, a qualidade do parceiro potencial ou o seu status de acasalamento.⁸⁶

Estudos recentes demonstraram que os compostos presentes na cutícula de machos e fêmeas de uma população de *A. fraterculus*, proveniente da província de Tucumán, Argentina, é uma mistura de hidrocarbonetos saturados e insaturados, predominando, *n*-alcanos, alcanos, metil-ramificados, alcenos e alcadienos, com o número de carbonos variando entre treze a trinta e sete átomos de carbono e que o perfil de hidrocarbonetos presente nas cutículas de machos e fêmeas diferencia-se tanto em qualidade quanto em quantidade.⁸⁷

No Brasil, apesar de todos os estudos direcionados a caracterização das populações de *A. fraterculus*, muito pouco se sabe no que se refere a identificação dos hidrocarbonetos cuticulares (CHCs) e esta pode ser uma ferramenta para diagnóstico de populações diferentes desta espécie, desde que a atividade biológica destes compostos seja elucidada.

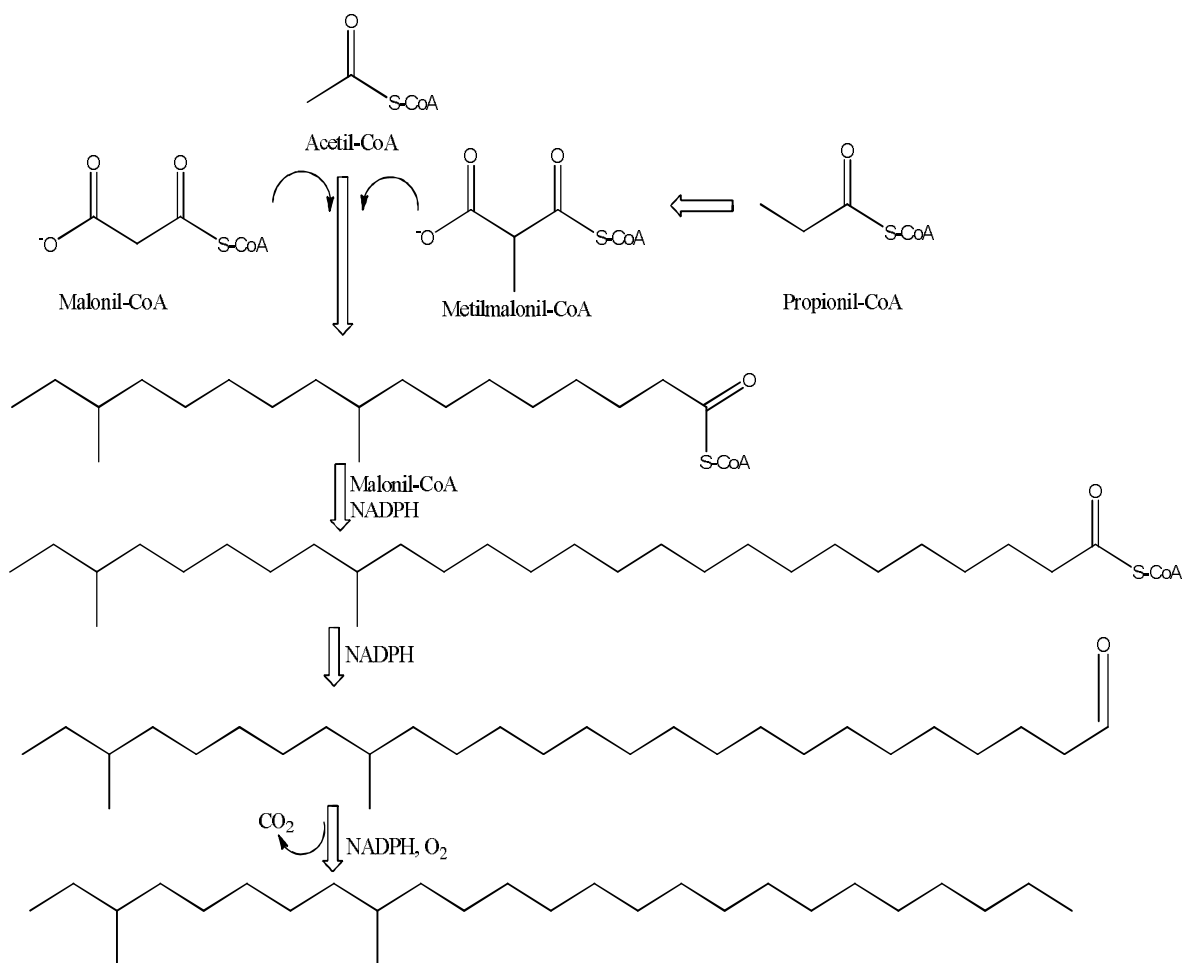


Figura 1. Rota de biosíntese proposta para cadeias de hidrocarbonetos ramificadas

Feromônio de marcação do hospedeiro

Do ponto de vista da procura por sítios de oviposição, quando os recursos para o forrageamento de insetos estão fixados em uma determinada localidade (por exemplo, folhas, frutos, larvas), a eficiência das fêmeas na busca por um substrato adequado aumenta caso elas sejam capazes de reconhecê-lo rapidamente e evitar os hospedeiros infestados. O uso de feromônios de marcação do hospedeiro (FMH) constitui uma estratégia de sucesso para minimizar a superlotação e para provocar o afastamento de áreas já ocupadas.⁸⁸

O comportamento de marcação do hospedeiro inclui a inserção do acúleo pela fêmea na polpa do fruto, mantendo o ovipositor em posição perpendicular à superfície.⁸⁹ As fêmeas não depositam ovos obrigatoriamente, mas, em alguns casos, removem o acúleo marcando

somente a punctura ou, com o acúleo protraído, depositam o FMH.⁹⁰ Assim, este feromônio é um sinal químico coespecífico associado com um hospedeiro que foi ocupado pelo inseto.⁹¹ Esse tipo de sinal é normalmente percebido por quimiorreceptores de contato e é geralmente produzido por fêmeas para funcionar como arrestante para fêmeas coespecíficas, evitando, desta forma, uma multi-infestação do hospedeiro.⁹²

Em moscas-das-frutas, a ação de marcação do sítio de oviposição já foi observada para 10 espécies do gênero *Anastrepha*⁹⁰ e o comportamento de marcação do hospedeiro já foi descrito para três espécies de *Anastrepha*: *A. suspensa*,⁹³ *A. fraterculus*⁹⁴ e *A. ludens*.⁹⁵ Em *Anastrepha*, de maneira análoga ao que acontece com a espécie *Ceratitis capitata* e algumas espécies do gênero *Rhagoletis*,^{96,97} a presença do FMH não evita que outros indivíduos da mesma espécie deixem de exibir os comportamentos de oviposição e de marcação de fruto. Fêmeas de *A. ludens* depositam seus ovos em *grapefruits* marcadas anteriormente, ao menos três vezes, por fêmeas coespecíficas. A baixa concentração do feromônio parece estimular a marcação contínua do hospedeiro e, em concentrações maiores, a oviposição parece ser desestimulada. Tal comportamento em *A. ludens*, por exemplo, é regulado pela adaptação sensorial ou habituação ao feromônio de marcação em conjunto com a inibição dose-dependente do comportamento locomotor.⁹²

Nas espécies do gênero *Anastrepha*, cujos FMHs já foram identificados, descobriu-se que eles são compostos polares (facilmente dissolvidos em água e metanol) e notadamente estáveis diante de variações de pH, condições de luz e temperatura ambiental.⁸⁹ Para *A. ludens*, *A. obliqua* e *A. serpentina*, além da função territorial, demonstrou-se que extratos metanólicos de fezes de uma espécie de mosca eliciam atividade biológica arrestante idêntica nas três espécies testadas, indicando uma função de reconhecimento interespecífico mútuo.⁹⁸

Dentre os estudos relacionados à identificação de FMHs em espécies de *Anastrepha* destaca-se um trabalho conduzido com *A. ludens*, que reporta a extração, determinação estrutural, síntese e a atividade biológica de FMHs nesta espécie, presentes no extrato metanólico de suas fezes. Neste trabalho, o ácido (L)-2-(R)-2-(2,14-dimetil-pentadecanoilamino-pentanodióico) é descrito como o HMP de *A. ludens*, e a atividade arrestante de oviposição deste composto e de dois análogos sintéticos, DM-HMP (ácido (L)-2-(R)-2-metil-pentadecanoilamino]-pentanodióico e a anastrefamida (mistura diastereoisomérica dos ácidos (L)-2-(R)-2-metil-hexadecanoilamino]-pentanodióico e (L)-2-(S)-2-metil-hexadecanoilamino]-pentanodióico 1:1) foi evidenciada, em espécies de *Anastrepha* de

importância econômica tais como *A. fraterculus*, *A. grandis*, *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina*, *A. striata* e *A. suspensa*.⁹⁹

Anastrefamida e DM-HMP também foram avaliados como arrestantes de oviposição de *A. obliqua* em pomares tropicais de ameixa e manga. Os resultados obtidos indicaram uma redução do nível de infestação em pomares de ameixas da ordem de 53.3% e 58.7%, respectivamente, no 18º e 26º dia após aplicação. A anastrefamida, por sua vez, reduziu em 73.9% o nível de infestação nesses pomares, 20 dias após a aplicação, resultando numa diminuição de 80% do número de larvas por fruto.¹⁰⁰ Estudos posteriores com os quatro diasteroisômeros do HMP demonstraram um efeito arrestante para o derivado (*R*)-L, DM-HMP e para a anastrefamida de maneira análoga ao efeito produzido pelo produto natural HMP.¹⁰¹ As estruturas destes compostos estão descritas na Figura 2.

Estes estudos demonstram a importância potencial do uso de FMHs no manejo de moscas-das-frutas, incluindo *Anastrepha* spp. Inicialmente foi proposta a utilização destes compostos em uma estratégia push-pull (produto arrestante associado a um produto atraente instalado em armadilhas),^{100,101} todavia, não indicada para o controle de espécies com alta taxa de crescimento populacional. Foi postulado que o emprego de FMHs no controle de *Anastrepha* spp. pode ser viável em quatro situações distintas de infestação: 1) em frutos cujo tempo de permanência na árvore é pequeno, como é o caso de ameixas, mangas e goiabas; 2) em frutos de alto valor comercial, como é o caso dos cultivos de maçã; 3) de frutos orgânicos e 4) de frutos cuja utilização de inseticidas é severamente restrita.¹⁰⁰

Interação dos compostos voláteis de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* com as substâncias voláteis dos hospedeiros

Além do enfoque feromonal, os compostos voláteis produzidos por tefritídeos envolvem relações evidentes com os seus hospedeiros. Tem sido bem documentado que as plantas hospedeiras podem influenciar o comportamento sexual de insetos herbívoros de diversas maneiras, dentre elas a produção ou a liberação de compostos voláteis pelos insetos e a busca por sítios apropriados para oviposição.¹⁰² Adicionalmente, os feromônios também podem agir de maneira associada aos aleloquímicos (ex. ação sinérgica de feromônios de agregação e compostos da planta hospedeira) ou terem sua emissão influenciada pelos

aleloquímicos (ex. produção de feromônios de agregação somente na presença da planta hospedeira).^{102,103}

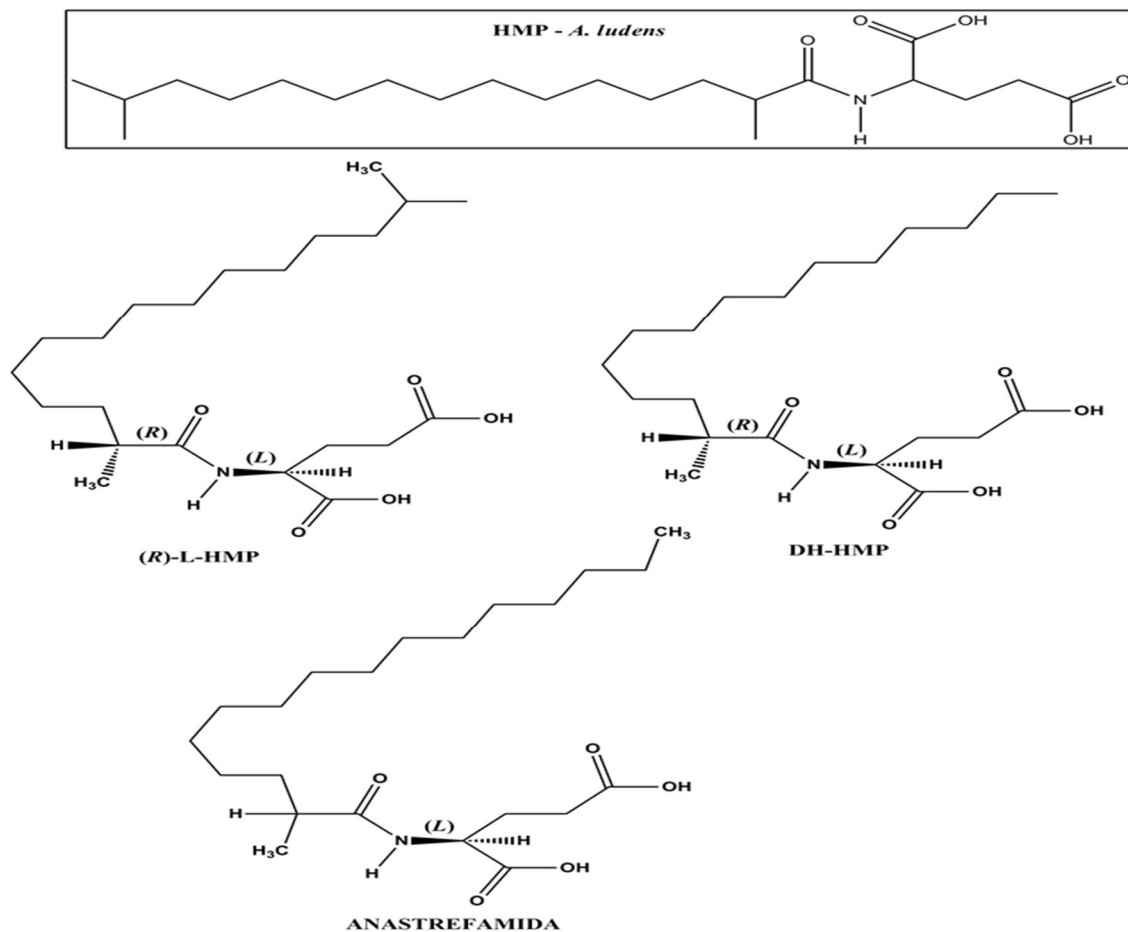


Figura 2. Estrutura dos compostos descritos como feromônio de marcação de hospedeiro com efeito arrestante para *Anastrepha* spp. *A. ludes*. HMP: ácido N-(2,14-dimetil-1-oxopentadecil)-glutâmico; (R)-L: (L)-2(R)-2-(2,14 - dimetilpentadecanoilamino)-pentanodióico); ácido DM-HMP:(ácido (L)-2-(R)- 2-metil-pentadecanoilamino]-pentanodióico e; Anastrefamida: mistura diastereoisomérica 1:1 dos ácidos (L)-2-(R)-2-metil-hexadecanoilamino]- pentanodióico e (L)-2-(S)-2-metil-hexadecanoilamino]-pentanodióico

Para os insetos, dentre os estímulos químicos, o olfato é considerado o principal sentido na localização de parceiros para a cópula (feromônios) e de plantas hospedeiras (caioromônios). Tefritídeos adultos podem detectar compostos voláteis de frutos a vários

metros de distância e estes estímulos são utilizados por essas moscas para orientação em direção à planta hospedeira. Após o encontro, o fruto é escolhido com base na cor, forma, tamanho e compostos voláteis por ele liberados.^{104,105} Tem sido demonstrado que odores emitidos pelos frutos influenciam a cópula, a alimentação e a oviposição.¹⁰⁶ Esses odores podem estimular uma maior ou menor atratividade, em decorrência da idade, *status* de cópula e experiência dos insetos com o hospedeiro.¹⁰⁷ A avaliação da resposta de *Anastrepha ludens* aos compostos voláteis de laranja e manga, verdes e maduras, indicaram que machos e fêmeas acasaladas foram significativamente mais atraídos aos frutos das duas espécies quando estavam verdes, enquanto os não copulados foram mais atraídos por frutos maduros.¹⁰⁸

Estudos envolvendo o efeito da idade em relação às respostas eletroantegráficas (EAG) de *Anastrepha suspensa* a duas substâncias atraentes, indicaram que as fêmeas desta espécie apresentaram maior sensibilidade à amônia, quando estavam sexualmente imaturas, e ao dióxido de carbono, quando estavam maduras. Contudo, em testes comportamentais, foi verificado que tanto as fêmeas imaturas quanto as maduras foram atraídas pela amônia. De acordo com os autores ocorre a liberação dessa substância, principalmente, quando alguns alimentos proteicos estão em estágio de decomposição, atraindo naturalmente as moscas para estes recursos.¹⁰⁹

Comparando os extratos de aeração de machos de *A. obliqua* em chamamento e os de frutos de *Avehrroa carambola* (Oxalidaceae), demonstrou-se que os mesmos apresentaram como compostos em comum, a 2-hexanona, identificada dentre os compostos voláteis liberados pelos frutos de carambola nos estágios de maturação verde e intermediário, e o *cis*-ocimeno, identificado apenas nos extratos de frutos no estágio verde. O hexanoato de etila, encontrado no extrato obtido pela lavagem da câmara de aeração dos insetos, foi identificado como composto majoritário nos estágios de maturação do fruto já mencionados. Nos frutos dos três estágios de maturação, principalmente dos estágios intermediário e maduro, foram identificados outros ésteres contendo seis átomos de carbono na cadeia principal, saturados e insaturados, que têm possibilidade de serem convertidos em hexanoato de etila. Além disso, embora o 3-octenoato de etila não tenha sido encontrado nos extratos de frutos de *A. carambola*, o qual foi identificado tanto nos extratos de aeração de machos quanto nos de lavagem da câmara de aeração, uma série de ésteres saturados e insaturados contendo oito átomos de carbono na cadeia foram encontrados nos frutos de carambola em estágio

intermediário de maturação e nos completamente maduros. Esses compostos coincidentes demonstraram a existência de similaridade na composição química dessas duas misturas de substâncias voláteis.¹¹⁰

Estudos posteriores demonstraram que, entre os extratos de secreções de glândulas salivares de machos de *A. obliqua* e aqueles de seu fruto hospedeiro, a carambola, o estágio de maturação verde, preferido por fêmeas da espécie para oviposição, coincidiu em oito compostos dos quinze identificados para o fruto, são eles: a 2-heptanona, a 3-octanona, a 2-octanona, o hexanoato de etila, o heptanoato de metila, o 2-etil-1-hexanol, o limoneno e o (*Z*)- β -ocimeno, levantando a hipótese de que estes constituintes químicos podem ser adquiridos por esses machos ainda nos primeiros instares larvais e que poderiam também ser responsáveis pela atração das fêmeas para frutos desse estágio de maturação.¹¹¹

Em 2006,¹¹² foi demonstrado que fêmeas e machos de *A. obliqua* são atraídas para extratos de frutos maduros de *Spondias mombin* L (Anacardiaceae) e, análises químicas destes extratos por CG-EAG e CG-EM, , evidenciaram nove compostos, foram eles: butirato de etila, butirato de isopropila, hexan-1-ol, butirato de propila, butirato de isopropila, hexanoato de etila, butirato de isopentila, benzoato de etila e etanoato de etila. A mistura sintética destes compostos, na proporção encontrada na mistura natural, foi atrativa tanto em bioensaios conduzidos em túnel de vento quanto para iscas em gaiolas de campo, as quais capturaram mais insetos de *A. obliqua* do que a proteína hidrolizada ou a água. A influência desse hospedeiro na composição do feromônio sexual da espécie não afeta a produção dos compostos voláteis pelos machos, mas possivelmente interfere na sua liberação.¹¹³

Um estudo comparativo entre os compostos voláteis liberados por machos de *A. fraterculus*, e por seu hospedeiro preferencial, os frutos de *Psidium guava*, realizado pelo grupo de Ecologia Química, da Universidade Federal de Alagoas, demonstrou que alguns compostos estão presentes nas misturas liberadas por frutos e por machos desta espécie, porém testes comportamentais com os mesmos ainda estão sendo conduzidos (dados não publicados). Recentemente, o efeito da exposição à polpa da goiaba, limão e manga no sucesso de acasalamento de machos de *A. fraterculus* foi avaliado. Foi constatado que o desempenho sexual aumenta na presença dos dois primeiros, sugerindo que o α -copaeno, presente em maior quantidade neles, em detrimento da manga, seria o composto responsável por este efeito, apesar da possibilidade do envolvimento de outros compostos, visto que o fruto libera uma mistura complexa de compostos voláteis.¹¹⁴

CONCLUSÕES

As informações fornecidas nesta revisão apontam que os tefritídeos, de maneira geral, utilizam sinais químicos para intermediar as interações intra- e interespecíficas. Uma diversa gama de compostos oxigenados faz parte da mistura feromonal liberada por machos de *Anastrepha* spp. e, embora existam componentes comuns a algumas espécies, a mistura feromonal de cada uma delas é espécie-específica, sugerindo que tais componentes podem servir como diagnóstico de identificação de espécies e/ou populações distintas. É evidente a semelhança química existente entre os constituintes voláteis liberados por machos de *Anastrepha* e por seus hospedeiros, assim como o é a participação dos compostos voláteis dos hospedeiros na escolha e na atração de adultos de *Anastrepha* spp. No tocante às espécies que compõem o complexo de espécies crípticas de *Anastrepha*, estudos químicos e comportamentais são imprescindíveis para a compreensão do mesmo, de modo que se faz necessário à sua continuidade. Assim poderão ser reunidas informações suficientes que permitam a elaboração de protocolos que auxiliem no diagnóstico das espécies pertencentes a este complexo e, conseqüentemente, em estratégias de manejo desta praga pelos fruticultores.

AGRADECIMENTOS

Às Instituições de fomento CAPES e CNPq pelas bolsas concedidas (Ds.C, PNPD e PQ) e à International Atomic Energy Agency (IAEA) da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO-ONU, Proc. Nº 16051) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Kist, B. B.; Vencato, A. Z.; Carvalho, C.; Reetz, E. R.; Poll, H.; Beling, R. R.; *Brasílian Fruit Yearbook*, 1^ªed., Gazeta Santa Cruz: Santa Cruz do Sul, 2012.
2. Duarte, A. L.; Malavasi, A. Em *Moscas das Frutas de importância Econômica no Brasil*; Malavasi, A.; Zucchi, R. A., eds.; Holos: Ribeirão Preto, 2000, cap.25.
3. Santos, J. P.; Corrent, A. R.; Berton, O.; Schwarz, L. L.; Denardi, F.; *Rev. Bras. Frutic.* **2008**, 30, 118.
4. Malavasi, A.; Nascimento, A. S.; Carvalho, R. S.; *Anais do Terceiro Seminário Internacional de citros-MIP*, Campinas, Brasil, 1994.
5. Aguiar-Menezes, E. L.; Ferrara, F. A. A.; Menezes, E. B. Em *Citricultura Fluminense: principais pragas e seus inimigos naturais*; Cassino, P. C. R.; Rodrigues, W. C., eds.; Seropédica: Universidade Rural, 2004, 67-84.
6. <http://faostat.fao.org>, acessada em Dezembro 2010.
7. IAEA.; *Trapping Guidelines for Area-Wide Fruit Fly Programmes*, 1^ªed., IAEA: Vienna, 2003.
8. Kovalski, A.; Ribeiro, L. G. Em *Produção integrada de frutas: O caso da maçã no Brasil*; Protas, J. F. S.; Sanhueza, R. M. V., eds.; Embrapa uva e vinho: Bento Gonçalves, 2003, 34.
9. Scoz, P. L.; Botton, M.; Garcia, M. S.; *Ciência Rural* **2004**, 34, 1689.
10. Carvalho, R. S.; Nascimento, A.S.; Matragalo, V.J.R. Em *Moscas das Frutas de importância econômica no Brasil*; Malavasi, A.; Zucchi, R. A., eds.; Holos: Ribeirão Preto, 2000, cap.14.
11. Zarbim P. H. G.; Rodrigues, M. A. C. M.; Lima, E. R.; *Quim. Nova* **2009**, 32, 722.
12. Norrbom, A. L., Zucchi, R. A.; Hernandez-Ortiz, V. Em *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*; Aluja, M.; Norrbom, A. L., eds.; CRC: Boca Raton, 1999, cap. 12.
13. McPherson, B. A., Han, H. Y., Silva, J. G.; Norrbom, A. L. Em *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of Behavior*; Aluja, M.; Norrbom, A. L., eds.; CRC: Boca Raton, 1999, cap. 13.
14. <http://www.sel.barc.usda.gov:591/diptera/Tephritl/TephHosts/search.Html>, acessada em Setembro 2012.

15. Norrbom, A. L.; Korytkowski, C. A.; *Zootaxa* **2009**, 2182.
16. Norrbom, A. L.; Korytkowski, C. A.; *Zootaxa* **2011**, 2740.
17. Norrbom, A. L.; Korytkowski, C. A.; *Zootaxa* **2012**, 3778.
18. Nascimento, A. A.; Carvalho, R. S. Em *Moscas das Frutas de importância Econômica no Brasil*; Malavasi, A.; Zucchi, R. A., eds.; Holos: Ribeirão Preto, 2000, cap. 22.
19. Zucchi, R. A. Em *Moscas das Frutas de importância econômica no Brasil*; Malavasi, A.; Zucchi, R. A., eds.; Holos: Ribeirão Preto, 2000, cap.1.
20. Aluja, M.; *Annu. Rev. Entomol.* **1994**, 39, 155; Salles, L. A. B.; *An. Soc. Entomol. Bras.* **1995**, 24(3), 423; Steck, G. J.; *The South American fruit fly Anastrepha fraterculus (Wied.): Advances in Artificial Rearing Taxonomic Status and Biological Studies*, 1th ed., IAEA: Vienna, 1999; Zucchi, R.A. Em *Moscas das Frutas de importância econômica no Brasil*; Malavasi, A.; Zucchi, R.A., eds.; Holos: Ribeirão Preto, 2000, cap. 4.
21. Hernandez-Ortiz,V.; *El género Anastrepha Schiner (Diptera: Tephritidae). Taxonomía, distribución y sus plantas huéspedes*. 1th ed., Xalapa: Veracruz, 1999.
22. Malavasi, A.; Zucchi, R. A.; Sugayama, R. L.; Em *Moscas das Frutas de importância econômica no Brasil (conhecimento básico e aplicado)*; Malavasi, A.; Zucchi, R.A., eds.; Holos: Ribeirão Preto, 2000, cap. 10.
23. Stone, A.; *The Fruit Flies of the genus Anastrepha*. Miscellaneous: Washington, 1942.
24. Bush,G. L.; *Psyche* **1962**, 68, 87.
25. Morgante,J. S.; Malavasi, A.; Bush, G. L.; *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1980**, 73, 622.
26. Malavasi, A.; Morgante, J. S.; *Genetica* **1983**, 60, 207.
27. Selivon, D.; Morgante, J. S.; Perondini, A. L. P.; *Braz. J. Genet.* **1997**, 20, 253.
28. Selivon, D.; Perondini, A. L. P.; *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1998**, 91, 474.
29. Selivon, D.; Perondini, A. L. P.; Morgante, J. S.; *Genet. Mol. Biol.* **1999**, 22, 507.
30. Selivon, D.; Vretos, C.; Perondini, A. L. P.; *Neotrop. Entomol.* **2003**, 32, 527.
31. Smith-Caldas, M. R. B.; Mcpheron, B. A.; Silva, J. G.; Zucchi, R. A.; *Neotrop. Entomol.* **2001**, 30, 565.
32. Hernández-Ortiz, V.; Gómez-Anaya, J. A.; Sánchez, A.; Mcpheron, B. A.; Aluja, M.; *Bull. Entomol. Res.* **2004**, 94, 487.
33. Selivon, D.; Vretos, C.; Fontes, L.; Perondini, A. L. P.; *Proceedings, 6th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance*; Stellenbosch, South Africa, 2002.

34. Petit-Marty, N.; Vera, M. T.; Calcagno, G.; Cladera, J. L.; Segura, D. F.; Allinghi, A.; Rodriguero, M.; Gómez-Cendra, P.; Viscarret, M. M.; Vilard, J. C.; *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2004**, *97*, 1320.
35. Selivon, D.; Perondini, A. L. P.; Morgante, J. S.; *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2005**, *98*, 367.
36. Vera, M. T.; Cáceres, C.; Wornoayporn, V.; Islam, A.; Robinson, A. S.; De La Vega, M. H.; Hendrichs, J.; Cayol, J. P.; *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2006**, *99*, 387.
37. Marcon, H. S.; Domingues, D. S.; Coscrato, V. E.; Selivon, D.; Perondini, A. L. P.; Marino, C. L.; *Neotrop. Entomol.* **2011**, *40*, 568.
38. Hernandez-Ortiz, V.; Bartolucci, A. F.; Morales-Valles, P.; Frias, D.; Selivon, D.; *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2012**, *105*, 305.
39. Selivon, D.; Perondini, A. L. P. Em *Moscas de la fruta ver Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): Diversidad, Biología y Manejo*; Hernández-Ortiz, V., ed.; SyG: Distrito Federal, Mexico, 2007, 119-132.
40. Cáceres, C.; Segura, D. F.; Vera, M. T.; Wornoayporn, V.; Cladera, J. L.; Teal, P.; Sapountzis, P.; Bowtzis, K.; Zacharopoulou, A.; Robinson, A. S.; *Biol. J. Linn. Soc.* **2009**, *97*, 152.
41. Segura, D. F.; Vera, M. T.; Rull, J.; Wornoayporn, V.; Islam, A.; Robinson, A. S.; *Biol. J. Linn. Soc.* **2011**, *102*, 346.
42. Nordlund, D. A.; Lewis, W. J.; *J. Chem. Ecol.* **1976**, *2*(2), 211.
43. Dicke, M.; Sabelis, M. W.; *Funct. Ecol.* **1988**, *2*, 131.
44. Lima, E. R.; Della-Lucia, T. M.C. Em *Feromônios de Insetos*; Vilela, E. F.; Della Lucia, T. M. C., eds.; Holos: Ribeirão Preto, 2001, cap. 1.
45. Corrêa, A. G.; Sant'Ana, J. Em *Produtos naturais no controle de insetos*; Ferreira, J. A. C.; Corrêa, A. G.; Vieira, P., eds.; UFSCar: São Carlos, 2001, cap. 1.
46. Atkins, M. D.; Boeckh, J. Em *Insect communication*; Lewis, T., ed.; Macmillan: New York, 1984, 123-149.
47. Sivinski, J.; Aluja, M.; Dodson, G. N.; Freidberg, A.; Headrick, D. H. Em *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*; Aluja, M.; Norrbom, A. L., eds.; CRC: Boca Raton, 2000, cap. 28.
48. Kaneshiro, K. Y.; Landolt, P. J.; Faucheux, M. J.; *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **1991**, *20*, 291.

49. Landolt, P. J.; Averill, A. L. Em *Pheromones of Non-lepidopteran Insects Associated with Agricultural Plants*; Hardie, J.; Minks, A.K., eds.; CABI: New York, 1999, 3-25.
50. Malavasi, A.; Barros, M. D.; *Anais do I Encontro sobre Moscas-das-frutas*, Campinas, Brasil, 1988.
51. Nation, J. L. Em *Fruit Flies their Biology, Natural Enemies and Control*, Robson, A. S.; Hooper, G., eds.; Elsevier: Amsterdam, 1989, 189-205.
52. Kroiss, J.; *Tese de doutorado*, Universität Regensburg, Regensburg, Alemanha, 2008.
53. Vilela, E. F.; Kovalski, A. Em *Moscas das frutas de importância econômica no Brasil (conhecimento básico e aplicado)*; Malavasi, A.; Zucchi, R. A., eds.; Holos: Ribeirão Preto, 2000, cap. 11.
54. Prokopy, R. J.; Roitberg, B. D. *Am. Sci.* **1984**, 72, 49.
55. Light, D. M.; Jang, E. B.; Dickens, J. C.; *J. Chem. Ecol.* **1988**, 14, 159.
56. Katsoyanos, B. I.; Kouloussis, N. A.; Papadopoulos, N. T.; *Entomol. Exp. Appl.* **1997**, 82, 181.
57. Fletcher, B. S. *Nature* **1968**, 219.
58. Nation, J. L. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1972**, 65, 1364; Perdomo, A. J.; *Tese de Doutorado*, University of Florida, USA, 1974; Katsoyannos, B. I.; *Environ. Entomol.* **1976**, 5, 474; Landolt, P. J., Heath, R. R.; King, J. R.; *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1985**, 78, 751.
59. Sivinski, J.; Burk, T. Em *Fruit Flies their Biology, Natural Enemies and Control*; Robson, A. S.; Hooper, G., eds.; Elsevier: Amsterdam, 1989, 91-103.
60. Sugayama, R. L.; Malavasi, A. Em *Moscas das frutas de importância econômica no Brasil*; Malavasi, A.; Zucchi, A. R., eds.; Holos: Ribeirão Preto, 2000, cap. 12.
61. Robacker, D. C.; Hart, W. G.; *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1985**, 78, 488.
62. Ponce, W. P.; Nation, J. L.; Emmel, T. C.; Smittle, B. J.; Teal, P. E. A.; *J. Chem. Ecol.* **1993**, 19, 3045.
63. Battiste, M. A.; Streckowski, L.; Vanderbilt, D. O.; Vinisck, M.; King, R. W.; Nation, J. L.; *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 2611.
64. Chuman, J.; Sivinski, J.; Heath, R. R.; Calkins, C. O.; Tumlinson, J. H.; Battiste, M. A.; Wydra, R. L.; Streckowski, L.; Nation, J. L. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 6561.
65. Tumlinson, J.H.; *J. Chem. Ecol.* **1988**, 14, 2109.
66. Nation, J.L.; *Proceedings of the International Symposium on the Biology and Control of Fruit Flies*, Okinawa, Japan, 1991.

67. Rocca, Jr.; Nation, J.L.; Streckowski, L.; Battiste, M.A.; *J. Chem. Ecol.* **1992**, *18*, 223.
68. Sivinski, J.M.; Epsky, N.; Heath, R.R.; *J. Insect Behav.* **1994**, *7*, 43.
69. Lu, F.; Teal, P.E.E.; *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2001**, *48*, 144.
70. Heath, R.R.; Landolt, P. J.; Robacker, D.C.; Dueben, B.D.; Epsky, N. Em *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*, Aluja, M.; Norrbom, A.L., eds.; CRC: Boca Raton, 2000, cap. 29.
71. Ibañez-López, A.; Cruz-López, L.; *Folia Entomologica Mexicana* **2001**, *40*, 221.
72. Gonçalves, G.B.; *Qualificação de doutorado*, Universidade Federal de Alagoas, Brasil, 2004.
73. López-Guillén, G.; Cruz-López, L.; Malo, E.A.; Rojas, J.C.; *Fla. Entomol.* **2011**, *94*, 874.
74. Robacker, D.C.; Aluja, M.; Bartelt, R.J.; Patt, J.; *J. Chem. Ecol.* **2009**, *35*, 601.
75. Robacker, D.C.; Aluja, M.; Cossé, A.A.; Sacchetti, P.; *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2009**, *102*, 500.
76. Lima, I.S.; Howse, P.E.; Stevens, D.R. Em *Fruit Fly Pests: A World Assessment of their Biology and Management*, MacPherson, B.A.; Steck, G.J., eds.; St Lucie: London, 1996, 91-99.
77. Lima, I.S.; Howse, P.E.; Do Nascimento, R.R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, *12*, 196.
78. Santos, J.C.G.S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Alagoas, Brasil, 2003.
79. Vanicková, L.; *Tese de Doutorado*, Institute of Chemical Technology, República Theca, 2012.
80. Lockey, K. H.; *Insect Biochem.* **1981**, *11*, 549.
81. Lockey, K. H.; *Comp. Biochem. Physiol.* **1988**, *89*, 595.
82. Howard, R. W.; Blonquist, G. J.; *Annu. Rev. Entomol.* **2005**, *50*, 371.
83. Blonquist, G. J.; Bagnères, A. G.; *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical ecology*, 1st ed., Cambridge University: Cambridge, 2010.
84. Blonquist, G. J.; Howard, R. W.; Em *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*, Blonquist, G. J.; Vogt, R. G., eds.; Academic Press: London, **2003**.
85. Vrkoslav, V.; Muck, A.; Cvacka, J.; Svatos, A.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 220.
86. Carlson, D. A.; Yocom, S. R.; *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1986**, *3*, 397; Lavine, B. K.; Carlson, D. A. Calkins, C. O.; *Microchem. J.* **1992**, *45*, 50; Goh, S. H.; Ooi, K. E.; Chang, C. H.; Yong, H. S.; Khoo, S. G.; Ong, S. H.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1993**, *21*, 215; Sutton, B. D.;

- Carlson, D. A.; *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1993**, *23*, 53; Sutton, B. D.; Steck, G. J.; *Fla. Entomol.* **1994**, *77*, 231.
87. Vaníčková, L.; Svatoš, A.; Kroiss, J.; Kaltenpoth, M.; Do Nascimento, R. R.; Hoskovec, M.; Břízová, R.; Kalinová, B.; *J. Chem. Ecol.* **2012**, *38*, 1133.
88. Prokopy, R. J. Em *Semiochemicals: Their Role in Pest Control*; Nordlund, D. A.; Jones, R. L.; Lewis, W. J., eds.; Wiley & Sons: New York, 1981, 283-295.
89. Díaz-Fleischer, F.; Papaj, D. R.; Prokopy, R. J.; Norrbom, A. L.; Aluja, M. Em *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*, CRC: Boca Raton, 2000, cap. 30.
90. Silva, M. A.; Bezerra-Silva, G. C. D.; Mastragelo, T.; *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2012**, *55*, 835.
91. Nufio, C. R.; Papaj, D. R.; *Entomol. Exp. Appl.* **2001**, *99*, 273.
92. Papaj, D. R.; Aluja, M.; *Physiol. Entomol.* **1993**, *18*, 279.
93. Prokopy, R. J.; Spatcher, P. J.; *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1977**, *70*, 960.
94. Prokopy, R. J., Malavasi, A.; Morgante, J. S.; *J. Chem. Ecol.* **1982**, *8*, 763.
95. Boeckh, J. Em *Insect Communication*; Lewis, T., ed.; Macmillan: New York, 1984, 83-104.
96. Prokopy, R. J.; *Environ. Entomol.* **1972**, *1*, 326.
97. Papaj, D. R.; Roitberg, B. D.; Opp, S. B.; *J. Anim. Ecol.* **1989**, *58*, 955.
98. Aluja, M.; Díaz-Fleischer, F.; *J. Chem. Ecol.* **2006**, *32*, 351.
99. Aluja-Schuneman, M. R.; Díaz-Fletcher, F.; Edmunds, A. J. F.; Haggmann, L.; *US pat 6,555,120* **2003**.
100. Aluja, M.; Díaz-Fletcher, F.; Boller, E. F.; Hurter, J.; Edmunds, A. J. F.; Haggmann, L.; Patrian, B.; Reyes, J.; *J. Econ. Entomol.* **2009**, *102*, 2268.
101. Edmund, A. J. F.; Aluja, M.; Díaz-Fletcher, F.; Patrian, B.; Haggmann, L.; *Chimis* **2010**, *64*, 37.
102. Landolt, P. J.; Philips, T. W.; *Annu. Rev. Entomol.* **1997**, *42*, 371.
103. Reddy, G. V. P.; Guerrero, A.; *Trends Plant Sci.* **2004**, *9*, 253.
104. Robacker, D. C.; Garcia, J. A.; Hart, W. G.; *Environ. Entomol.* **1990**, *19*, 403.
105. Aluja, M.; Prokopy, R. J.; *Physiol. Entomol.* **1992**, *17*, 1.
106. Landolt, P. J.; Reed, H. C.; Heath, R. R.; *Environ Entomol.* **1992**, *21*, 1154.
107. Cornelius, M. L.; Duan, J. J.; Messing, R. H.; *J. Econ. Entomol.* **2000**, *93*, 93.
108. García-Ramírez, M.; Cibrián, T. J.; Arzufí, B. R.; López, C. J.; Soto, H. M.; *Agrociencia* **2004**, *38*, 423.

109. Kendra, P. E.; Montgomery, W. S.; Mateo, D. M.; Puche, H.; Epsky, N. D.; Heath, R. R.; *Environ. Entomol.* **2005**, *34*, 584.
110. Gonçalves, G.B.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Alagoas, Brasil, 2001.
111. Gonçalves, G. B.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Alagoas, Brasil, 2005.
112. Cruz-Lopes, L; Malo, E. A.; Toledo, A. V.; Del Mazo, A.; Rojas, J. C.; *J. Chem. Ecol.* **2006**, *32*, 351.
113. Lopez-Guillén, G.; Cruz-López, L.; Malo, E. A.; Gonzáles-hernadéz, H.; Cazares, C. L.; López-Collado, J. T.; Rojas, J.; *Environ. Entomol.* **2008**, *37*, 876.
114. Vera, M. T.; Ruiz, M. J.; Oviedo, A.; Abrahan, S.; Mendonza, M.; Segura, D. F.; Kouloussis, N. A.; Willink, E.; *J. Appl. Entomol.* **2010**, *137*, 2.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DO FEROMÔNIO DO COMPLEXO DE ESPÉCIES CRÍPTICAS *Anastrepha fraterculus* (DIPTERA:TEPHRITIDAE)

PHEROMONE ANALYSES OF THE *ANASTREPHA FRATERCULUS* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) CRYPTIC SPECIES COMPLEX

RADKA BRÍZOVÁ^{1,2}, ADRIANA L. MENDONÇA³, LUCIE VANÍČKOVÁ^{3*}, ALANA L. MENDONÇA³, CARLOS EDUARDO DA SILVA³, ALEŠ TOMČALA¹, BEATRIZ AGUIAR JORDÃO PARANHOS⁴, VANESSA SIMÕES DIAS⁵, IARA SORDI JOACHIM-BRAVO⁵, MICHAL HOSKOVEC¹, BLANKA KALINOVÁ¹ AND RUTH R. DO NASCIMENTO³

¹Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, Flemingovo nám. 2, CZ-166 10 Prague 6, Czech Republic

²Institute of Chemical Technology in Prague, Technická 5, CZ-166 28 Prague 6, Czech Republic

³Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Avenida Lourival de Melo Mota, s/n, Tabuleiro, 57072-970, Maceió, AL, Brazil

⁴Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-Semiárido), BR 428, Zona Rural, 56302-970, Petrolina, PE, Brazil

⁵Universidade Federal da Bahia, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Geral. R. Barão do Geremoabo s/n, Campus Universitário de Ondina, 40170-290, Salvador, BA, Brazil

*Corresponding author; E-mail: luci.vanickova@gmail.com

Supplementary material for this article in *Florida Entomologist* 96(3) (2013) is online at <http://purl.fcla.edu/fcla/entomologist/browse>

RESUMO

O complexo de espécies crípticas *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) é, hoje em dia, um dos modelos de insetos-praga mais estudados no que se refere à especiação e compatibilidade populacional. O aperfeiçoamento das técnicas empregadas no controle de insetos-praga é fundamentado no sucesso da introdução de populações de laboratório entre as populações selvagens. A comunicação mediada por feromônios desempenha, uma importante função no processo de acasalamento da mosca-das-frutas Sul Americana. Deste modo, o principal objetivo do presente estudo foi investigar a composição do feromônio de sete populações diferentes de *A. fraterculus*, oriundas de regiões brasileiras geograficamente distintas e da Argentina. Quatorze compostos voláteis, provenientes de misturas liberadas por machos em chamamento, foram identificados por CGxCG/TOF-EM e os dados obtidos foram subsequentemente submetidos a análises estatísticas multivariada. A composição do feromônio variou qualitativamente e quantitativamente entre as populações estudadas. Estes resultados poderão servir como base para futuras análises eletrofisiológicas.

Palavras-Chave: mosca-das-frutas Sul-Americana, Cromatografia Gasosa Bidimensional acoplada a detector Time-of-Flight e Espectrometria de Massas (CGxCG/TOF-EM), Análises de Componente Principal (ACP).

ABSTRACT

The South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex is presently one of the most studied pest models in terms of speciation and population mating compatibility. The improvement of pest-control techniques has strongly relied on successful implementation of laboratory strains into wild populations. Pheromone communication plays an important role in the mating process in the South American fruit fly. Therefore, the main goal of the present study was to investigate the pheromone composition of seven different populations, originating from geographically distant locations in Brazil and Argentina. Fourteen volatile compounds were identified in calling male emanations by GC×GC/TOF-MS and the data obtained were subsequently analyzed by multivariate statistics. The pheromone composition varied both quantitatively and qualitatively among the studied populations. These results will serve as the basis for further electrophysiological analyses.

Key-Words: South American fruit fly, two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection (GC×GC/TOF-MS), principal component analysis (PCA)

INTRODUÇÃO

Anastrepha Schiner (1868) é o gênero economicamente mais importante de Tephritidae na América tropical e subtropical, incluindo espécies de pragas importantes tais como a mosca-das-frutas Sul Americana, *A. fraterculus* (Wiedemann) (Norrbon & Korytkowski 2011). O grupo *fraterculus* inclui 29 espécies (Smith-Caldas *et al.* 2001; Norrbom & Korytkowski 2011) e é atualmente conhecido por constituir um complexo de espécies crípticas (denominado Complexo AF) que exhibe níveis consideráveis de isolamento reprodutivo pré- e pós-zigótico (Selivon *et al.* 1999; Vera *et al.* 2006; Cáceres *et al.* 2009; Segura *et al.* 2011). Vários estudos revelaram diferenças de morfologia (Stone 1942), cariótipos (Bush, 1962), isoenzimática (Morgante *et al.* 1980) e preferência de hospedeiros (Malavasi *et al.* 1983) entre populações do complexo *fraterculus*. Recentemente, as diferenças entre as populações foram observadas na morfologia de ovos, desenvolvimento embrionário, características morfométricas, DNA mitocondrial altamente repetitivo e compatibilidade de acasalamento entre algumas populações da América do Sul (Selivon & Perondini 1998; Steck & Shepard 1993; Smith-Caldas *et al.* 2001; Rocha & Selivon 2004; Selivon *et al.* 1999, 2005; Hernandez-Ortiz *et al.* 2004, 2012; Ludena *et al.* 2010; Solferini & Morgante 1987; Vera *et al.* 2006; Cáceres *et al.* 2009, Rull *et al.* 2012). Baseado em uma abrangente descrição morfológica, foram determinados sete morfotipos de *A. fraterculus* (Hernández-Ortiz *et al.* 2012). No Brasil, três dessas entidades têm sido referidas como *A. sp. 1 aff. fraterculus*, *A. sp. 2 aff. fraterculus* (Yamada & Selivon 2001), and *A. sp. 3 aff. fraterculus* (Selivon *et al.* 2005). Estudos de uma população do sudeste brasileiro têm mostrado compatibilidade de acasalamento entre algumas populações de *A. fraterculus* e indicaram que outras não são compatíveis (Vera *et al.* 2006). Recentemente, não foi encontrada nenhuma evidência de isolamento reprodutivo entre duas populações da região sul do Brasil e uma população da Argentina (Rull *et al.* 2012). Além disso, existem variações no período da atividade sexual de algumas populações, o acasalamento pode ocorrer na parte da manhã, outros ao meio-dia e outros à tarde (Vera *et al.* 2006; Segura *et al.* 2011).

Estes resultados são muito interessantes e encorajam o estudo de comunicação química no complexo AF, que desempenha um papel importante entre os estímulos auditivos e visuais que levam ao acasalamento. Diferenças na composição de feromônio sexual de dípteros, dentro de um enigmático complexo de espécies de *Dasineura oxycoccana* (Johnson)

(Diptera: Cecidomyiidae), foram recentemente encontrados em mosquitos coletados de cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton; Ericaceae) e de blueberry highbush (*Vaccinium corymbosum* L., Ericaceae) (Fitzpatrick *et al* 2013). Evidências de polimorfismo vêm a partir de estudos do feromônio de machos de *Drosophila* (Jalom 1987; Rouault 2001, 2004; Fedina *et al.* 2012; Grillet *et al.* 2012, Bontonou *et al.* 2012), e de complexos de espécies crípticas em abelhas (Eltz *et al.* 2011), vespas (Niehuis *et al.* 2013) e mariposas (Droney *et al* 2012.; Groot *et al.* 2013).

O feromônio sexual dos machos de *A. fraterculus*, foi estudado com estirpes laboratoriais, e recentemente, as diferenças quantitativas e qualitativas na composição de voláteis liberados por machos sexualmente maduros a partir de populações do sul do Brasil, Argentina e Peru e seus híbridos (Lima *et al.* 2001; Cáceres *et al.* 2009), foram encontradas, sugerindo que variações de feromônio poderia ser um indicativo de especiação. No entanto, há uma falta de estudos investigando a composição do feromônio que cobriria uma amostra mais ampla de populações brasileiras. Portanto, realizou-se um estudo comparativo de voláteis produzidos por machos, com o objetivo de descrever as diferenças ou semelhanças no feromônio de sete populações geograficamente distantes do complexo AF. Além disso, o presente trabalho foi realizado a fim de fornecer o produto químico básico para futuras análises comportamentais e eletroantenográficas.

MATERIAL E MÉTODOS

Insetos

As pupas de populações de laboratório de *A. fraterculus* foram obtidas a partir de diferentes localidades: San Miguel de Tucumán (Argentina) oriundas do Laboratório da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura/Agência Internacional de Energia Atômica (FAO/IAEA) Seibersdorf, Áustria; Bento Gonçalves (sul do Brasil) sedidas pela Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, sul do Brasil); Piracicaba (sudeste do Brasil), São Joaquim, Vacaria e Pelotas (sul do Brasil) fornecidas pelo Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brasil e Alagoas (nordeste do Brasil) criação do Laboratório de Ecologia Química, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Brasil (Fig. 1). A população de Seibersdorf foi mantida no

Instituto de Química Orgânica e Bioquímica, Praga, República Tcheca, considerando que as populações restantes foram mantidas no Departamento de Biologia Animal da UFBA e Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL. Protocolos idênticos foram usados para alimentar e manter essas populações em condições de laboratório. Após a emergência as moscas foram separadas de acordo com sexo. Elas foram alimentadas com uma dieta artificial composta de uma mistura de levedura de cerveja e açúcar de cana (3:1) e água mineral. As salas de criação dos insetos foram mantidas a 25 °C, 60 % RH e fotoperíodo normal de 14:10h (C:E.). Foram usadas moscas sexualmente maduras, com 20 dias idade, para os experimentos.

Coleta de Voláteis

Os constituintes químicos voláteis liberadas por machos, de todas as populações, de *A. fraterulus* foram obtidos através da técnica *headspace* dinâmico. Especificamente, grupos de 20 machos virgens e sexualmente maduros foram colocados em câmaras de vidro (500 ml). As câmaras foram aeradas por uma corrente de ar filtrado (1 mL/min). Os voláteis liberados pelos machos em chamamento foram carregados pela corrente de ar e adsorvidos sobre filtros contendo o material adsorvente (100 mg SuperQ, Chrompack), que foram colocados na saída da câmara. Os constituintes voláteis foram recolhidos por um período de 24h, a partir de 9:00h e terminando 09:00h do dia seguinte, o processo foi repetido cinco vezes. Os voláteis foram subsequentemente dessorvidos a partir dos filtros por 500 µL de hexano destilado (Sigma-Aldrich). Os extratos foram armazenados em um freezer até a análise química.

CGxCG/TOF-EM

A cromatografia em fase gasosa bidimensional com detecção *Time-of flight* de Espectrometria de massa (CGxCG/TOF-EM) foi utilizada para a identificação dos voláteis obtidos pelo *headspace* dinâmico. Uma alíquota de 1,0 µL de cada extrato hexânico obtido foi injetada utilizando o equipamento HP 7683 autosample sob o modo “*splitless*” em um Cromatógrafo bidimensional a Gás (Marca Shimadzu e modelo 17A) acoplado a um detector seletivo de massas com tempo-de-voo (marca Shimadzu, modelo QP 5050A e LECO pegasus

4D) (LECO Corp., St. Joseph, MI, USA) equipado com criomodulador *quad-jet* estacionário. As colunas capilares DB-5 (30m x 250µm x 0,25µm) (J&W Scientific, Folsom, California) e BPX-50 (2m x 100µm x 0,1µm) (SGE Inc., Austin, Texas) foram utilizados para CG na primeira e segunda dimensão, respectivamente. Foi utilizado o hélio como gás de arraste a um fluxo constante de 1mL/min. As temperaturas da CG×CG/TOF-EM foram fixadas em 220°C no injector, 260°C na linha de transferência e 250°C na fonte de íons. O programa de temperatura do primeiro forno do CG foi: 40°C durante 2 min, em seguida, 40-190°C à 5°C / min , e, finalmente 190-320°C a 20°C/min, com uma retenção de 2 min a 320°C. Enquanto que o programa do segundo forno estava 10°C mais elevada do que no primeiro, e sendo operada no modo de iso-rampa. O período de modulação, a duração de pulso quente e o tempo de fase fria foram estabelecidas a 5, 0,8 e 1,7s, respectivamente. O espectrômetro de massas foi operado no modo de impacto de elétrons (IE, 70 eV). A taxa de aquisição de dados foi de 100 Hz para a faixa de massa de 29-400u. O detector possui voltagem de 1750 V. O tempo de purga foi de 60s em um fluxo de 60 mL/min. Os dados foram processados e os cromatogramas em 2D e 3D foram visualizados pelo emprego do software LECO ChromaTOF™. Um padrão de n-alcenos (C8 - C22) (Sigma - Aldrich) foi co-injectado com amostras autênticas, para determinar os seus índices de retenção (IR). Os compostos foram identificados através de comparação dos seus padrões, fragmentação dos espectros de massas, tempos de retenção e índices de retenção com os dados publicados anteriormente e padrões autênticos (Sigma- Aldrich). Na ausência de padrões, as identificações foram efetuadas por comparação com a biblioteca: referências espectrais no NIST, no registro Wiley/NBS de dados de espectrometria de massa (McLafferty et al. 1989) e nos índices de retenção publicados (Adams 2007; Jang et al. 1989 , Vanicková et al. 2012a , 2012b).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram submetidos às análises estatísticas, os dados obtidos a partir da análise química (N = 5) dos extratos contendo os voláteis liberados por machos de 20 dias de idade, avaliando as áreas de picos dos 14 compostos identificados nas misturas voláteis emitidas, de todas populações estudadas de *A. fraterculus*. Para uma análise mais aprofundada foram utilizados os cinco compostos que tiveram atividade antenal para populações de Tucuman,

Argentina (Brizová et al., 2010). Esses dados foram submetidos a análises estatísticas multivariadas através do software CANOCO 4,5 (Biometris, Plant Research International, Wageningen UR, Holanda), a área percentual de cada composto identificado nos extratos foi calculada, submetida à transformação logarítmica e analisados estatisticamente pelo método de Análise dos Componentes Principais (PCA). Nas análises de PCA, as amostras com perfis químicos semelhantes se agrupam e segregam daqueles que são diferentes. A significância estatística foi avaliada através da análise de redundância (RDA), uma variante canônica de PCA, e do teste de permutação Monte Carlo (permutações irrestritas, n =999). Na análise de RDA, as identidades de cada uma das sete populações manteve-se como um indicador categórico. A análise RDA é também capaz de revelar os compostos responsáveis pela segregação da amostra. Alguns dos dados das últimas análises podem ser encontrados no material suplementar desse artigo.

RESULTADOS

Foram encontradas diferenças qualitativas e quantitativas significativas na composição das amostras dos extratos hexânicos dos voláteis emitidos pelos machos das seis populações brasileiras e uma população da Argentina de *A. fraterculus*. A quantidade total dos voláteis produzidos pelos machos variou entre as sete populações (Fig. 2). As áreas dos picos da produção volátil originária de cada uma das duas populações do sul do Brasil (Bento Gonçalves e São Joaquim) foi em média 2,4 vezes maior do que as das demais populações, que eram comparativamente parecidas entre si. A médias das áreas dos picos dos compostos voláteis identificados pelo CGxCG/TOF-MS dos machos das populações de São Joaquim e Bento Gonçalves atingiu $5,41 \times 10^7 \pm 0,40 \times 10^7$ counts e $4,34 \times 10^7 \pm 0,33 \times 10^7$ counts, enquanto que as médias das áreas dos voláteis das populações de Tucumán, Pelotas, Alagoas e Piracicaba atingiu $2,98 \times 10^7 \pm 0,30 \times 10^7$ counts, $2,23 \times 10^7 \pm 0,25 \times 10^7$ counts, $2,15 \times 10^7 \pm 0,26 \times 10^7$ counts e $1,87 \times 10^7 \pm 0,19 \times 10^7$ counts, respectivamente. A produção volátil mais baixa foi observada na população de Vacaria que atingiu $1,39 \times 10^7 \pm 0,15 \times 10^7$ counts, do total das áreas dos picos.

No total, foram identificados 14 compostos voláteis presentes nos extratos da mistura volátil de machos em chamamento, consistindo de terpenóides, álcoois e aldeídos (Tabela 1).

O limoneno (3) foi um dos componentes principais (> 17%) em Vacaria, Pelotas, São Joaquim e Alagoas. No entanto, 2-etil-hexan-1-ol (2) foi o composto principal (> 16%) presente nas populações de Vacaria e Bento Gonçalves. (*E, Z*)-3,6-nonadien-1-ol (7) e / ou (*E, E*)- α -farneseno (12) foram os principais compostos presentes nos extratos das populações de Piracicaba, Bento Gonçalves, São Joaquim, Tucúman e Alagoas. Em todas as populações os compostos que apareceram em menor quantidade (1-12%) foram o (*Z*)-3-nonen-1-ol (6), decenal (8), (*Z, E*)- α -farneseno (9), germacreno D (10), suspensolídeo (11), anastrefina (13) e epianastrefina (14). Nonanol (5) foi o componente minoritário em 5 populações, exceto em Vacaria (24%) e Tucúman (traços). (*Z*)- β -ocimeno (4%) estava ausente na mistura volátil da população de Alagoas, enquanto que nas demais populações ele apareceu como o composto de menor concentração (4%).

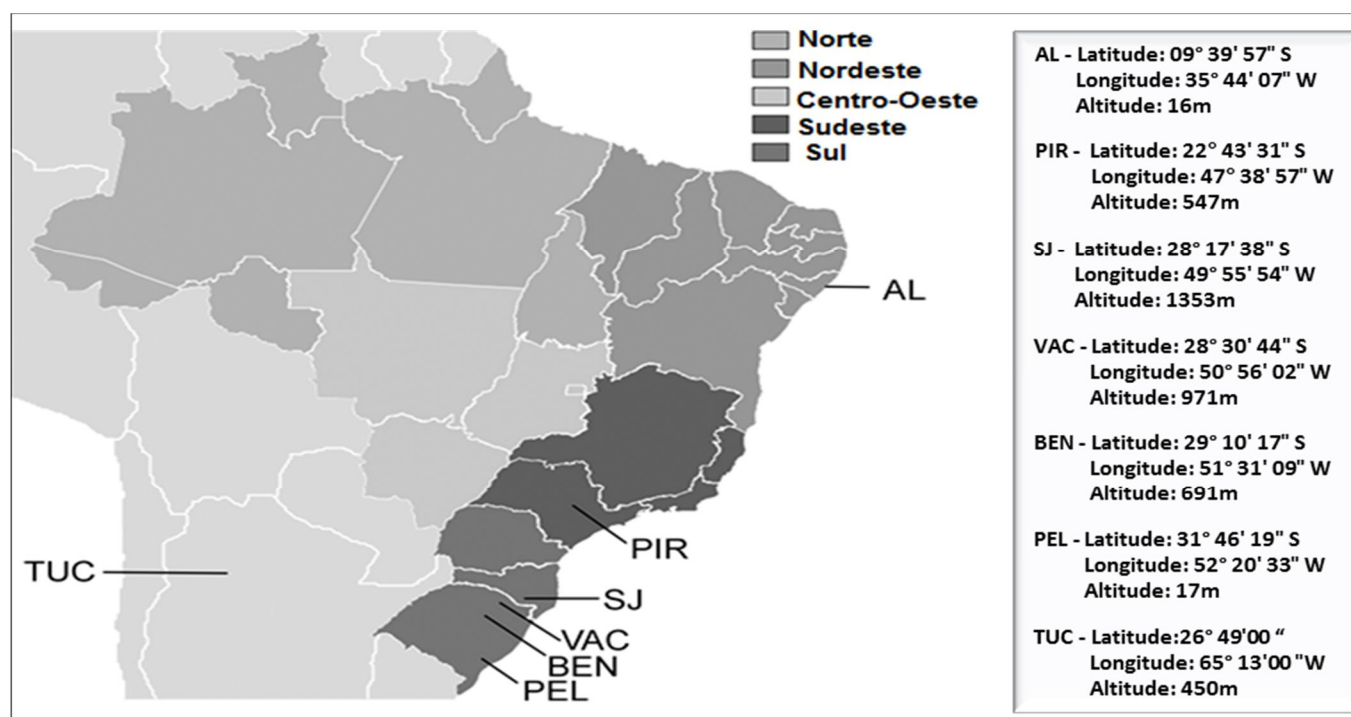


Fig. 1. Localizações das sete populações do complexo de espécies crípticas *Anastrepha fraterculus*. A localização das populações é denominada de acordo com a Tabela 1.

As análises de PCA e RDA das áreas de picos dos compostos feromonais mostram agrupamentos de populações específicas. Os compostos obtidos a partir da população de

Vacaria foram os que mais diferiram (Fig. 3), e os compostos responsáveis por esta divergência são germacreno D (10), decenal (8) e nonanal (5) (Fig. 4).

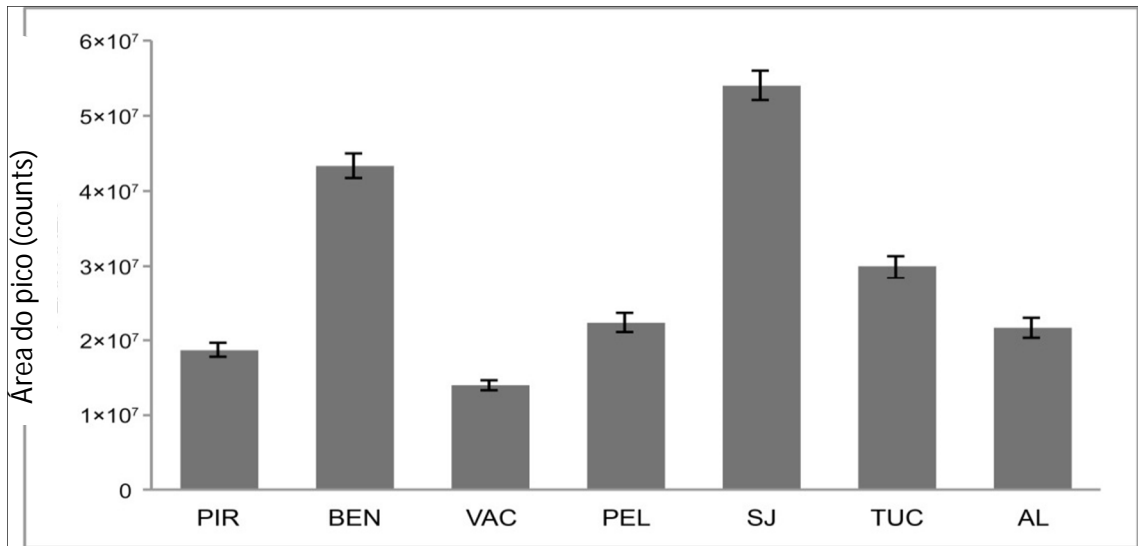


Fig. 2. Comparação da área total do volátil na mistura liberada por cada grupo de 20 machos em chamamento de *Anastrepha fraterculus* das 6 populações brasileiras (AL-Alagoas, SJ-São Joaquim, PEL-Pelotas, VAC-Vacaria, BEN-Bento Gonçalves e PIR-Piracicaba) e 1 população da Argentina (TUC-Tucumán).

Pode-se notar que as setas não representam as concentrações de um composto em particular, mas descreve o significado de alguns compostos espécies-específicos da mistura dos 14 compostos voláteis por machos de *A. fraterculus*. Devido a presença do p-cimeno (1) (Fig. 4), a segunda maior diferença foi observada na população de Pelotas (Fig. 3). As populações de Piracicaba e São Joaquim aparentemente são semelhantes (Fig. 3), mas a análise RDA revelou uma diferença significativa ($P < 0,01$) nos dados da composição feromonal (Fig. 4). Os resultados mostram que as populações de Pelotas, Vacaria, Alagoas e Tucumán estão claramente separadas, enquanto existe um grau de semelhança entre as populações de Bento Gonçalves, São Joaquim e Piracicaba. Entre todas as populações comparadas, Alagoas e Pelotas foram as que mais diferiram das demais.

TABELA 1. COMPOSTOS QUÍMICOS (MÉDIA DA PORCENTAGEM RELATIVA \pm % RSD) IDENTIFICADOS PELO CG \times CG/TOF- EM NOS EXTRATOS DE AERAÇÃO DOS MACHOS EM CHAMAMENTO DE ANASTREPHA FRATERCULUS A PARTIR DAS SETE POPULAÇÕES: PIR (PIRACICABA), BEN (BENTO GONÇALVES), VAC (VACARIA), PEL (PELOTAS), SJ (SÃO JOAQUIM), TUC (TUCUMÁN), AL (ALAGOÁS).

No.	Composto	IR^c	PIR	BEN	VAC	PEL	SJ	TUC	AL
1	<i>p</i> -Cimeno ^d	1022	2.61 \pm 0.62	1.50 \pm 1.02	6.94 \pm 1.42	35.75 \pm 8.62	3.71 \pm 1.00	3.29 \pm 1.39	12.19 \pm 4.00
2	2-Etil-hexan-1-ol ^d	1029	2.10 \pm 0.69	16.39 \pm 6.58	35.89 \pm 5.59	0.34 \pm 0.12	0.75 \pm 0.23	7.18 \pm 2.74	Tr
3	Limoneno ^a	1041	0.50 \pm 0.07	8.12 \pm 0.70	17.68 \pm 2.67	28.68 \pm 7.38	20.30 \pm 4.31	10.36 \pm 3.18	37.79 \pm 1.16
4	(<i>Z</i>)- β -Ocimeno ^a	1050	13.18 \pm 0.63	1.18 \pm 0.81	Tr	4.71 \pm 2.06	5.16 \pm 3.67	11.07 \pm 3.82	-
5	Nonanol ^d	1107	2.47 \pm 0.56	9.74 \pm 1.09	24.65 \pm 6.95	1.90 \pm 0.35	4.80 \pm 2.54	Tr	1.69 \pm 0.68
6	(<i>Z</i>)-3-Nonen-1-ol ^{a,*}	1159	0.18 \pm 0.25	8.91 \pm 0.09	0.23 \pm 0.02	Tr	0.84 \pm 0.40	4.23 \pm 1.64	0.45 \pm 0.07
7	(<i>E,Z</i>)-3,6-Nonadien-1-ol ^{a,*}	1161	33.73 \pm 5.60	28.48 \pm 1.74	0.58 \pm 0.06	Tr	13.34 \pm 3.96	15.62 \pm 1.99	31.20 \pm 2.78
8	Decenal ^d	1210	1.18 \pm 0.08	2.98 \pm 0.62	6.65 \pm 1.27	5.55 \pm 0.93	2.56 \pm 1.11	Tr	0.65 \pm 0.38
9	(<i>Z,E</i>)- α -Farneseno ^{a,*}	1495	1.74 \pm 0.28	0.73 \pm 0.38	0.26 \pm 0.05	1.39 \pm 0.24	3.21 \pm 1.74	2.92 \pm 1.32	0.17 \pm 0.06
10	Germacreno D ^d	1498	0.44 \pm 0.11	0.37 \pm 0.08	2.24 \pm 0.28	1.04 \pm 0.49	0.35 \pm 0.06	Tr	1.23 \pm 0.42
11	(<i>E,E</i>)-Suspensólideo ^a	1506	8.93 \pm 3.25	9.52 \pm 4.11	0.53 \pm 0.05	5.18 \pm 1.41	6.48 \pm 0.77	6.46 \pm 1.33	7.62 \pm 1.26
12	(<i>E,E</i>)- α -Farneseno ^{a,*}	1512	27.14 \pm 3.88	7.39 \pm 0.39	0.89 \pm 0.05	9.78 \pm 2.48	23.97 \pm 6.79	37.75 \pm 1.63	2.81 \pm 0.20
13	Anastrefina ^a	1617	1.98 \pm 0.49	0.82 \pm 0.08	0.59 \pm 0.06	1.65 \pm 0.21	2.93 \pm 1.12	0.42 \pm 0.11	1.85 \pm 0.46
14	Epianastrefina ^{a,*}	1621	3.80 \pm 0.28	3.87 \pm 1.12	2.86 \pm 0.23	4.03 \pm 0.48	11.59 \pm 4.48	0.71 \pm 0.36	2.35 \pm 0.69

^a Compostos identificados por comparação de padrões sintéticos. ^b Compostos identificados por comparação com a biblioteca NIST e registro do Wiley/NBS.

^c Índice de retenção calculados a partir dos tempos de retenção sobre a coluna capilar DB-5.

* Compostos antenalmente ativos identificados por CG-EAD da população de Tucumán (Břízová et al., 2010, 2011, Vaníčková et al., 2010). Tr \leq 0.1 %.

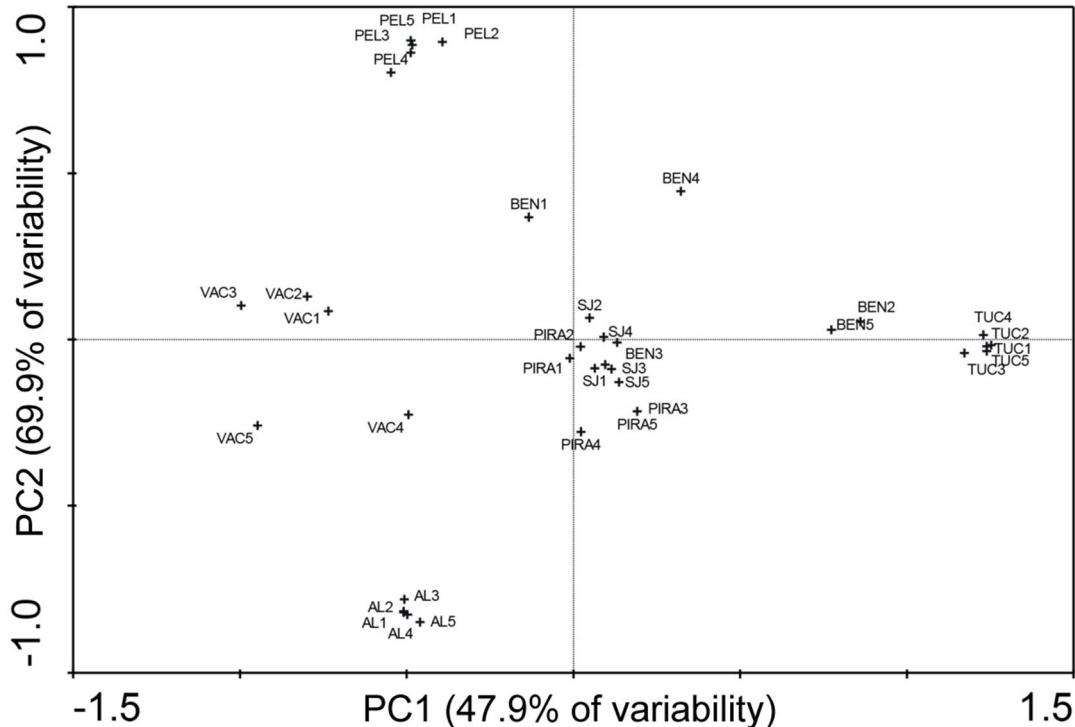


Fig. 3. Resultados da análise multivariada dos componentes principais (PCA) do feromônio sexual dos machos de *A. fraterculus* provenientes das sete diferentes populações (Bento Gonçalves-BEN 1-5, Pelotas-PEL 1-5, Piracicaba-PIRA 1-5, São Joaquim-SJ 1-5, Vacaria-VAC 1-5, Alagoas-AL 1-5 e Tucumán-TUC 1-5). As populações de Alagoas, Vacaria, Pelotas e Tucumán compreendem quatro grupos, claramente separados. As populações de Piracicaba, São Joaquim e Bento Gonçalves resultaram em um grupo misto. O número de amostras analisadas (N) para cada população foi de 5.

Considerando-se que a análise anterior de CG-EAG (Břízová *et al*, 2011; Vaničková *et al* 2010) dos voláteis liberados por machos da população de Tucumán revelou que 5 compostos provocaram atividade antenal das fêmeas, os dados das populações estudadas foram analisados e verificou-se que esses compostos antenalmente ativos estavam também presentes em todas as populações do estudo. Posteriormente, foi utilizada a RDA para comparar a importância destes cinco compostos [(Z)-3-nonen-1-ol (6), (E, Z) -3,6-nonadien-1-ol (7), (Z, E)- α -farneseno (9), (E, E)- α -farneseno (12), e epianastrefina (14)], revelando uma diferença significativa ($P < 0,01$) entre as 7 populações (Supl. Fig. 1).

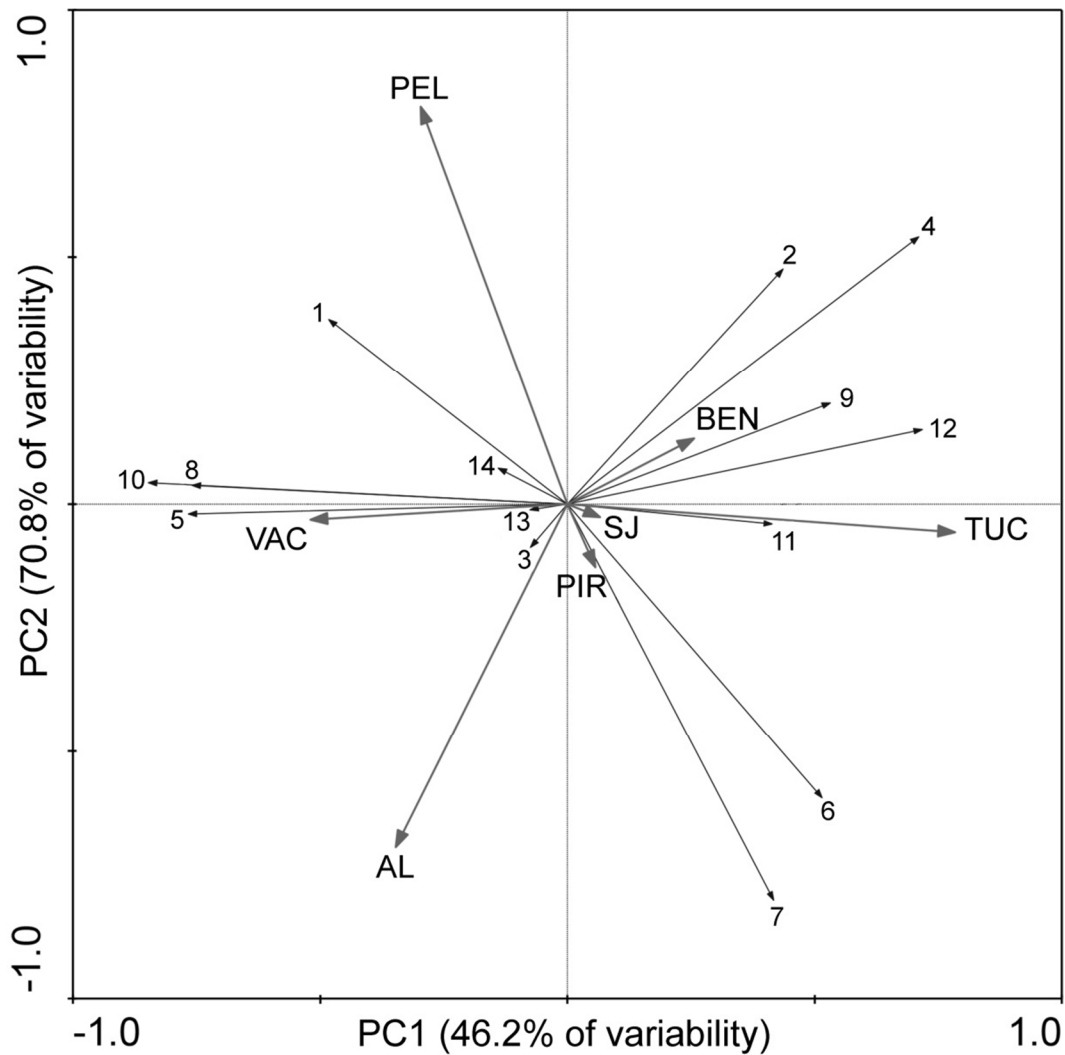


Fig. 4. Resultados da análise de redundância (RDA) do feromônio sexual dos machos de *A. fraterculus* das sete populações diferentes (AL-Alagoas, SJ-São Joaquim, PEL-Pelotas, VAC-Vacaria, BEN-Bento Gonçalves e PIR-Piracicaba) e 1 população da Argentina (TUC-Tucumán). A linha vertical separa Bento Gonçalves, São Joaquim, Piracicaba e Tucumán das populações de Pelotas, Vacaria e Alagoas. A linha horizontal separa Vacaria, Alagoas, Piracicaba, São Joaquim e Tucumán das populações de Bento Gonçalves e Pelotas. As setas representam os 14 compostos que são característicos das respectivas populações. Os compostos são numerados de acordo com a Tabela 1.

DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra que existem diferenças na composição dos voláteis liberados por machos das populações de moscas-das-frutas sul americana geograficamente

distintas. As quatro populações estudadas de *A. fraterculus* do sul do Brasil (Pelotas, Bento Gonçalves, Vacaria, São Joaquim), uma do sudeste do Brasil (Piracicaba), uma do nordeste do Brasil (Alagoas) e uma da Argentina (Tucumán) diferem quantitativa e qualitativamente na mistura compostos voláteis liberados por machos em chamamento e sexualmente maduros. Diferenças na composição do feromônio sexual de machos dentro do complexo *A. fraterculus* foram publicados por Lima *et al.* (2001) com base numa população de laboratório do sul do Brasil (Pelotas) e por Cáceres *et al.* (2009) com as populações de laboratório do Peru e da Argentina.

De acordo com a literatura, a composição química das misturas feromonais de alguns insetos pode ser afetada por, pelo menos, três fatores, que incluem controle genético, as condições ambientais e dieta. O papel da variação genética e da composição do feromônio sexual foi relatado em espécies de mariposas estreitamente relacionadas (Löfstedt 1990; Roelofs *et al.* 2002; Roelofs & Rooney 2003). Além disso, foi verificado o efeito do meio ambiente sobre a composição do feromônio sexual de *Drosophila melanogaster* (Meigen) em estudos de populações obtidas em altas e baixas latitudes (Rouault *et al.* 2001, 2004). Este polimorfismo do feromônio de machos em *Drosophila* é responsável também pelo isolamento reprodutivo entre as populações (Grillet *et al.* 2012; Bontonou *et al.* 2012). Foram relatadas diferenças na composição química de hidrocarbonetos cuticulares em machos de *Drosophila serrata* alimentados com 3 dietas diferentes (arroz, levedura e milho) (Rundle 2005). Recentemente, Fedina *et al.* (2012) relataram mudanças na atratividade sexual e na composição do feromônio influenciadas pela dieta em *D. melanogaster*. Vaníčková *et al.* (2012a, 2012b) descreveram diferenças quantitativas e qualitativas na composição do feromônio de machos de *Ceratitis capitata* originários de 3 populações diferentes. No caso de populações de *A. fraterculus*, os fatores que podem estar envolvidos nas diferenças químicas entre as misturas do feromônio sexual, são desconhecidos. Talvez uma combinação da genética e fatores ambientais possam ser responsáveis pelos resultados descritos neste trabalho.

Por exemplo, apesar da existência de compatibilidade sexual entre os adultos de *A. fraterculus* de populações de diferentes localidades do sul Brasil, ou seja, Bento Gonçalves, São Joaquim, Pelotas e Vacaria, relatada por Dias (2012), nenhum estudo comportamental foi

realizado para testar a atividade biológica dos compostos das misturas emitidas pelos machos em chamamento destas populações para descobrir quais são atraentes ou repelentes em fêmeas coespecíficas e heteroespecíficas. Além disso, não foram conduzidos estudos eletrofisiológicos para determinar quais os componentes dentro das misturas provocam respostas eletrofisiológicas coespecíficas e heteroespecíficas de diferentes populações brasileiras. No entanto, pesquisas realizadas por Břízová *et al.* (2010, 2011) e Vaníčková *et al.* (2010) demonstraram que cinco compostos encontrados em extratos de machos de *A. fraterculus* de uma população de laboratório da Argentina (Tucumán), utilizado no presente estudo, são antenalmente ativos para fêmeas coespecíficas. As identidades químicas destes compostos foram determinadas como: (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol, (*Z,E*)- α -farneseno, (*E,E*)- α -farneseno e epianastrephina. As análises multivariadas realizadas no presente estudo provaram que 4 destes 5 compostos são específicos para a população de Tucumán.

Vera *et al.* (2006) relataram o acasalamento parcial e a incompatibilidade entre as populações de *A. fraterculus* de Tucumán (Argentina) e Piracicaba (sul do Brasil). Recentemente, Dias (2012) relatou a incompatibilidade parcial entre as populações das regiões do sudeste (Piracicaba) e do sul (Pelotas, Vacaria, Bento Gonçalves e São Joaquim) do Brasil, ao passo que as populações brasileiras do sul eram compatíveis umas com as outras. Rull *et al.* (2012) confirmaram a compatibilidade entre as populações do sul do Brasil de Vacaria e Pelotas. A partir destes resultados, é possível especular que a incompatibilidade parcial pode ser, entre outros fatores, causada por diferença quantitativa de 5 compostos antenalmente ativos, como aqui relatado. Além disso, é possível admitir a hipótese de que também podem ser outros compostos do feromônio masculino, que são responsáveis pela atração e/ou repulsão de fêmeas coespecíficas e/ou heteroespecíficas. As diferenças entre as misturas feromonais liberadas pelos machos de diferentes populações brasileiras e argentinas de *A. fraterculus* encontradas aqui também podem ser reguladas por vários genes que podem influenciar as respostas das fêmeas destas populações e alterar a forma em que elas respondem as misturas feromonais liberadas por machos coespecíficos e heteroespecíficos. No entanto, precisam ser realizados estudos comportamentais eletrofisiológicos e genéticos para confirmar ou rejeitar esta hipótese.

REFERÊNCIAS CITADAS

- ADAMS, R. P. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation, Illinois, USA.
- BONTONOU, G., DENIS, B., AND WICKER-THOMAS, C. 2012. Male pheromone polymorphism and reproductive isolation in populations of *Drosophila simulans*. *Ecol. Evol.* 2: 2527-2536.
- BŘÍZOVÁ, R., VANÍČKOVÁ, L., KALINOVÁ, B., DO NASCIMENTO, R. R., AND HOSKOVEC, M. 2010. Sex specific differences in preception of the pheromone in *Anastrepha fraterculus*. Proc. 26th ISCE Annual Meeting, Tours, France, pp. 210.
- BŘÍZOVÁ, R. 2011. Analyses of male sex pheromone of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). MSc thesis. Institute of Chemical Technology Prague, Czech Republic.
- BUSH, G. L. 1962. The cytotaxonomy of the larvae of some Mexican fruit flies in the genus *Anastrepha*. *Psyche* 68: 87-101.
- CÁCERES, C., SEGURA, D. F., VERA, M. T., WORNOPYORN, V., CLADERA, J. L., TEAL, P., SAPOUNTZIS, P., BOURTZIS, P., ZACHAROPOULOU, A., AND ROBINSON, A. S. 2009. Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera; Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology. *Biol. J. Linn. Soc.* 97: 152-165.
- DIAS, V. S. 2012. Compatibilidade de acasalamento de populações do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) do Brasil. Dissertation thesis. Federal University of Bahia, Brazil.
- DRONEY, D. C., MUSTO, C. J., MANCUSO, K., ROELOFS, W. L., AND LINN, C. E. 2012. The response to selection for broad male response to female sex pheromone and its implications for divergence in close-range mating behavior in the European corn borer moth, *Ostrinia nubilalis*. *J. Chem. Ecol.* 38: 1504-1512.
- ELTZ, T., FRITZSCH, F., PECH, J. R., ZIMMERMANN, Y., RAMÍREZ, S. R., QUEZADA-EUAN, J. J. G., AND BEMBÉ, B. 2011. Characterization of the orchid bee *Euglossa viridissima* (Apidae: Euglossini) and a novel cryptic sibling species, by morphological, chemical, and genetic characters. *Zool. J. Linn. Soc. Lond.* 163: 1064-1076.
- FEDINA, T. Y., KUO, T.-H., DREISEWERD, K., DIERICK, H.A., YEW, J. Y., AND PLETCHER, S. D. 2012. Dietary effects on cuticular hydrocarbons and sexual attractiveness in *Drosophila*. *PLoS ONE.* 7: e49799.
- FITZPATRICK, S. M., GRIES, R., KHASKIN, G., PEACH, D.A. H., IWANSKI, J., AND GRIES, G. 2013. Populations of the gall midge *Dasineura oxycoccana* on cranberry and blueberry produce and respond to different sex pheromones. *J. Chem. Ecol.* 39: 37-49.

- GRILLET, M., EVERAERTS, C., HOUOT, B., RITCHIE, M. G., COBB, M., AND FERVEUR, J.-F. 2012. Incipient speciation in *Drosophila melanogaster* involves chemical signals. *Sci. Rep.* 2: 1-11.
- GROOT, A. T., STAUDACHER, H., BARTHEL, A., INGLIS, O., SCHÖFL, G., SANTANGELO, R. G., GEBAUER-JUNG, S., VOGEL, H., EMERSON, J., SCHAL, C., HECKEL, D.G., AND GOULD, F. 2013. One quantitative trait locus for intra- and interspecific variation in a sex pheromone. *Mol. Ecol.* 22: 1065-1080.
- HERNÁNDEZ-ORTIZ, V., GÓMEZ-ANAYA, J. A., SÁNCHEZ, A., MCPHERON, B. A., AND ALUJA, M. 2004. Morphometric analysis of Mexican and South American populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae) and recognition of a distinct Mexican morphotype. *Bull. Entomol. Res.* 94: 487-499.
- HERNÁNDEZ-ORTIZ, V., BARTOLUCCI, A. F., MORALESVALLES, P., FRÍAS, D., AND SELIVON, D. 2012. Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae): a multivariate approach for the recognition of South American morphotypes. *Ann. Entomol. Soc. America* 105: 305-318.
- JALLON, J. M., AND DAVID, J. R. 1987. Variations in cuticular hydrocarbons among the 8 species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Evolution* 41: 294-302.
- JANG, E. B., LIGHT, D. M., FLATH, R. A., NAGATA, J. T., AND MON, T. R. 1989. Electroantennogram responses of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* to identified volatile constituents from calling males. *Entomol. Exp. Appl.* 50: 7-19.
- LIMA, I. S., HOUSEB, P. E., AND DO NASCIMENTO, R. R. 2001. Volatile substances from male *Anastrepha fraterculus* Wied. (Diptera: Tephritidae): Identification and behavioural activity. *J. Brazilian Chem. Soc.* 12: 196-201.
- LÖFSTEDT, C. 1990. Population variation and genetic control of pheromone communication-systems in moths. *Entomol. Exp. Appl.* 54: 199-218.
- LUDENA, B., BAYAS, R., AND PINTAUD, J.-C. 2010. Phylogenetic relationships of Andean-Ecuadorian populations of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann 1830) (Diptera: Tephritidae) inferred from COI and COII gene sequences. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* 46: 344-350.
- MALAVASI, A., MORGANTE, J. S., AND PROKOPY, R. J. 1983. Distribution and activities of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) flies on host and non host trees. *Ann. Entomol. Soc. America* 76: 286-292.
- MCLAFFERTY, F. W., STAUFFER, D. B., STENHAGEN, E., AND HELLER, S. R. 1989. In McLafferty, F. W., Stauffer, D. B. [eds.], *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*, 1st edition. Wiley, New York, USA.

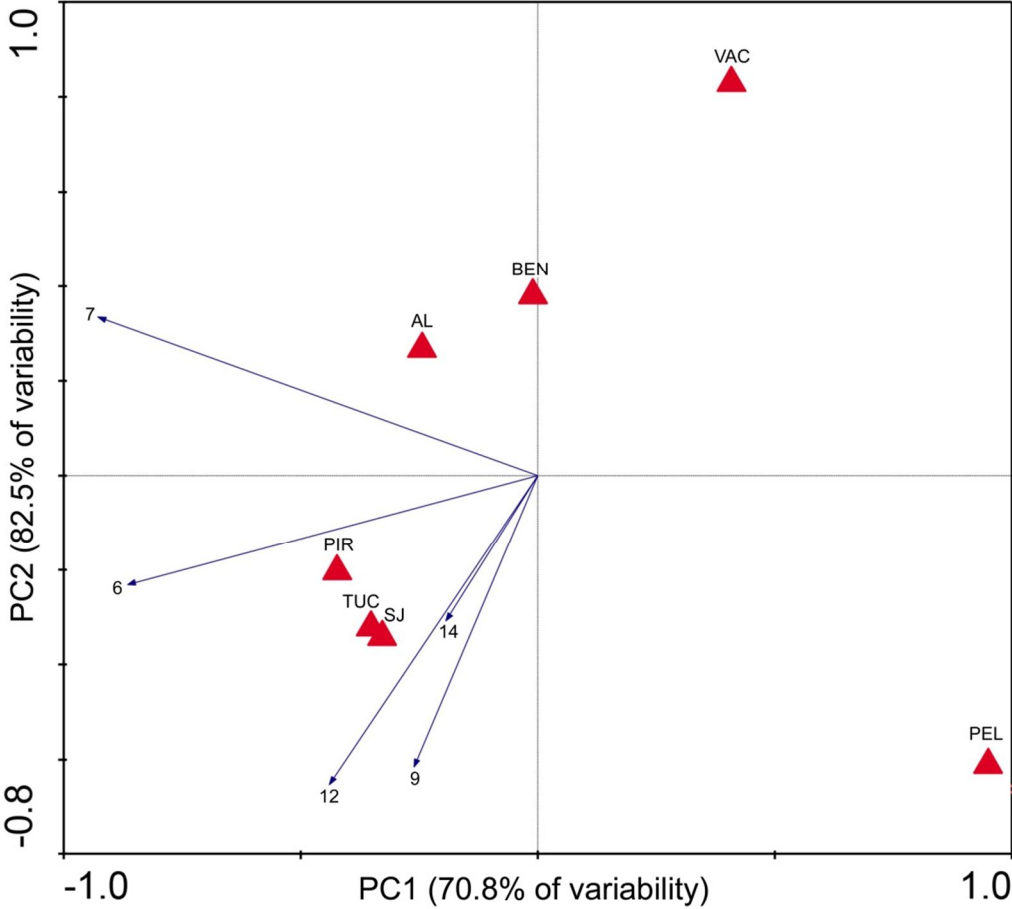
- MORGANTE, J. S., MALAVASI, A., AND BUSH, G.L. 1980. Biochemical systematics and evolutionary relationships of neotropical *Anastrepha*. Ann. Entomol. Soc. America 73: 622-630.
- NIEHUIS, O., BUELLESBACH, J., GIBSON, J. D., POTHMANN, D., HANNER, C., MUTTI, N. S., JUDSON, A.K., GADAU, J., RUTHER, J., AND SCHMITT, T. 2013. Behavioural and genetic analyses of *Nasonia* shed light on the evolution of sex pheromones. Nature 494: 345-348.
- NORRBOM, A. L., AND KORYTKOWSKI, C. A. 2011. New species of and taxonomic notes on *Anastrepha* (Diptera:Tephritidae). Zootaxa 2740: 1-23.
- ROELOFS, W. L., LIU, W., HAO, G., JIAO, H., ROONEY, A.P., AND LINN, C. E. J. 2002. Evolution of moth sex pheromones via ancestral genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 13621-13626.
- ROELOFS, W. L., AND ROONEY, A. P. 2003. Molecular genetics and evolution of pheromone biosynthesis in Lepidoptera. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 9179-9184.
- ROCHA, L. S., AND SELIVON, D. 2004. Studies on highly repetitive DNA in cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex, pp. 415-418, In Barnes B.N. [ed.], Proc. 6th Intl. Symp. on Fruit Flies of Economic Importance. Irene: Isteq Scientific Publ.
- ROUAULT, J., CAPY, P., AND JALLON, J.-M. 2001. Variations of male cuticular hydrocarbons with geoclimatic variables: an adaptive mechanism in *Drosophila melanogaster*? Genetica 110: 117-130.
- ROUAULT, J.-D., MARICAN, C., WICKER-THOMAS, C., AND JALLON, J.-M. 2004. Relations between cuticular hydrocarbon (HC) polymorphism, resistance against desiccation and breeding temperature; a model for HC evolution in *D. melanogaster* and *D. simulans*. Genetica 120: 195-212.
- RULL, J., ABRAHAM, S., KOVALESKI, A., SEGURA, D. F., ISLAM, A., WORNOAYPORN, V., DAMMALAGE, T., TOMAS, U. S., AND VERA, M. T. 2012. Random mating and reproductive compatibility among Argentinean and Southern Brazilian populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). Bull. Entomol. Res. 102:435-443.
- RUNDLE, H. D., CHENOWETH, S. F., DOUGHTY, P., AND BLOWS, M. W. 2005. Divergent Selection and the Evolution of Signal Traits and Mating Preferences. PLoS Biology. 3: e368.
- SEGURA, D. F., VERA, M. T., RULL, J., WORNOAYPORN, V., ISLAM, A., AND ROBINSON, A. S. 2011. Assortative mating among *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae)

hybrids as a possible route to radiation of the *fraterculus* cryptic species complex. Biol. J. Linnean Soc. 102: 346-354.

- SELIVON, D., AND PERONDINI, A. L. P. 1998. Eggshell morphology in two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera : Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. America 91: 473-478.
- SELIVON, D., PERONDINI, A. L. P., AND MORGANTE, J. S. 1999. Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera : Tephritidae). Gen. Mol. Biol. 22: 507-510.
- SELIVON, D., PERONDINI, A. L. P., AND ROCHA, L. S. 2005. Karyotype characterization of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae). Neotrop. Entomol. 34: 273-279.
- SMITH-CALDAS, M. R. B., MCPHERON, B. A., SILVA, J.G., AND ZUCCHI R. A. 2001. Phylogenetic relationships among species of the *fraterculus* group (*Anastrepha*: Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I. Neotrop. Entomol. 30: 565-573.
- SOLFERINI, V. N., AND MORGANTE, J. S. 1987. Karyotype study of eight species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). Carylogia 40: 229-241.
- STECK, G. J., AND SHEPPARD, W. S. 1993. Mitochondrial DNA variation in *Anastrepha fraterculus*, pp. 9-14 In M. Aluja and P. Liedo [eds.], Fruit flies: Biology and Management. Springer, New York.
- STONE, A. 1942. The fruit flies of the genus *Anastrepha*. U. S. Dep. Agric. Misc. Publ. 439: 1-112.
- VANÍČKOVÁ, L., KALINOVÁ, B., DO NASCIMENTO, R. R., BŘÍZOVÁ, R., AND HOSKOVEC, M. 2010. Pheromone production and preception in *Anastrepha fraterculus*. SIGMA conference, Czech Republic. Chem. Listy 104: 389-339.
- VANÍČKOVÁ, L., DO NASCIMENTO, R.R., HOSKOVEC, M., JEŽKOVÁ, Z., BŘÍZOVÁ, R., TOMÁLA, A., KALINOVÁ, B. 2012a. Are the wild and laboratory insect populations different in semiochemical emission? The case of medfly sex pheromone. J. Agric. Food Chem. 60: 7168-7176.
- VANÍČKOVÁ, L. 2012b. Chemical ecology of fruit flies: genera *Ceratitis* and *Anastrepha*. Dissertation thesis. Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic.
- VERA, M. T., CÁCERES, C., WORNOAYPORN, V., ISLAM, A., ROBINSON, A. S., DE LA VEGA, M. H., HENDRICHS, J., AND CAYOL, J. P. 2006. Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. America 99: 387-397.

YAMADA, S. M., AND SELIVON, D. 2001. Rose, an eye color mutation in a species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. America 94: 592-595.

Material suplementar



CAPÍTULO 3

IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO FEROMÔNIO SEXUAL EM *Anastrepha fraterculus* (WIEDEMANN, 1830) (DIPTERA: TEPHRITIDAE).

PAULO MILET-PINHEIRO^{1,2}, DANIELA MARIA DO AMARAL NAVARRO¹, NATHALY COSTA DE AQUINO³, LUANA LIMA FERREIRA³, RAPHAEL DE FARIAS TAVARES³, RITA DE CÁSSIA CORREIA DA SILVA³, ALANA DE LIMA-MENDONÇA³, LUCIE VANÍČKOVÁ^{3,4}, ADRIANA DE LIMA MENDONÇA³, RUTH RUFINO DO NASCIMENTO^{3*}

¹*Instituto de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil*

²*Institute of Experimental Ecology, University of Ulm, Germany*

³*Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Avenida Lourival de Melo Mota, s/n, Tabuleiro, CEP: 57072-970 Maceió, Alagoas, Brazil*

⁴*Infochemicals Research Group, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry ASCR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, CZ-166 10 Prague 6, Czech Republic*

*Autor para correspondência: ruth.nascimento@pq.cnpq.br, telephone: +55 82 3214-1755, fax number: +55 82 3214-1384

Foi submetido para: **Journal of Chemical Ecology**

Resumo- A mosca-das-frutas sul americana *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera:Tephritidae) é uma das mais destrutivas pragas polífagas da América do Sul. Nesta espécie, a agregação de machos é conhecida por emitir voláteis que atraem fêmeas, entretanto, a composição exata envolvida ainda permanece desconhecida. No presente estudo, foi investigada a composição química da mistura de voláteis emitida por machos com o objetivo de identificar os compostos específicos, dentro desta mistura, os quais mediam a resposta comportamental em fêmeas coespecíficas. Para tanto, conduziram-se análises químicas e eletrofisiológicas, bem como bioensaios. As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CGxCG-TOF/EM) revelaram a presença de 29 compostos nas amostras de aeração de machos de *A. fraterculus*. Apesar disso, as análises por Cromatografia Gasosa acoplada a detector eletroantografico (CG-EAG) demonstraram que somente seis compostos, a saber: α -pineno, limoneno, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol, (*E,E*)- α -farneseno and (*S,S*)-(-)-epianastrefina, eliciaram despolarização antenal em fêmeas de *A. fraterculus*. Uma mistura sintética obtida a partir dos compostos eletrofisiologicamente ativos eliciaram resposta comportamental em fêmeas de maneira similar àquela para extratos de aeração de machos coespecíficos, enquanto estes dois tratamentos eliciaram resposta maior do que para o controle hexano. Isto indica que estes seis compostos atuam como feromônio sexual de fêmeas de *A. fraterculus*. O presente estudo é a primeira etapa para o desenvolvimento de um método de controle efetivo de fêmeas ativas em pomares infestados.

Palavras-chave: *Anastrepha fraterculus*, feromônio sexual, atraente para fêmeas, CG-EAD, atividade comportamental.

Abstract- The South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera:Tephritidae) is one of the most destructive polyphagous pests in South America. In this species, male aggregations are known to emit volatiles that attract females; however, the exact compounds involved in this task remain unknown. In the present study, we investigated the chemical composition of the volatile blend emitted by males with the aim of identifying the specific compounds within this blend that mediate behavioral responses in conspecific females. For this purpose, we performed chemical and electrophysiological analyses, as well as bioassays. The analyses using two-dimensional gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC x GC-TOFMS) revealed the presence of 29 compounds in the headspace samples of *A. fraterculus* males. However, the analyses of gas chromatography coupled to electroantennographic detection (GC-EAD) showed that only six compounds, i.e. α -pinene, limonene, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol, (*E,E*)- α -farnesene and (*S,S*)-(-)-epianastrephin trigger antennal depolarization in females of *A. fraterculus*. A synthetic mixture composed of EAD-active compounds elicited behavioral response in females similarly to headspace samples of conspecific males, whereas these two treatments elicited higher responses than a hexane control. This indicates that these six compounds act as sex pheromone for *A. fraterculus* females. The present study is the first step for developing an effective control of female activity in infested orchards.

Key Words - *Anastrepha fraterculus*, sexual pheromone, female attractants, GC-EAD, behavioral activity.

INTRODUÇÃO

Anastrepha fraterculus (Wiedemann, 1830) (Diptera:Tephritidae) é economicamente uma das mais problemáticas espécies-praga da família Tephritidae na América do Sul. Esta espécie polífaga tem um impacto direto na produção de frutos, causando restrições quarentenárias na exportação para muitos países (Aluja & Norrbom 2001; Norrbom & Korytkowski 2011). De acordo com a FAO (Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas), a perda econômica causada pelas atividades de tefritídeos em frutos é estimada em cerca de 1,7 bilhão de dólares por ano (FAOSTAT 2010). Os danos diretos causados por esta mosca-das-frutas estão relacionados à punctura infligida pelas fêmeas durante a oviposição e a alimentação e desenvolvimento das larvas no interior do fruto. A punctura realizada durante a oviposição pode servir como porta de entrada para micro-organismos e geralmente resultam em aborto prematuro do fruto (Nascimento & Carvalho 2000).

O sistema de acasalamento de *A. fraterculus* é muito complexo e inclui o uso de sinais auditivos, visuais e químicos (Aluja 1994). No comportamento sexual desta espécie, os machos liberam compostos voláteis para atrair à um local de acasalamento, em primeiro lugar, os machos (formando leks) e, em seguida, as fêmeas conspecíficas. Uma vez que esses compostos químicos estão envolvidos na atração de machos e fêmeas para o mesmo local, eles podem ser classificados como feromônios de agregação, no entanto, uma vez que eles atuam como atraentes para as fêmeas, eles também podem ser considerados como um elemento do feromônio sexual do macho. Machos em chamamento inflam suas bolsas pleurais e agitam suas asas para produzir sons e disseminar compostos voláteis para atrair machos e fêmeas (Nation 1989; Heath *et al.* 2000). Os machos atraídos chegam ao local do lek, exibindo o comportamento de chamamento. As fêmeas atraídas para leks geralmente apresentam dois tipos de comportamento: limpeza de suas partes do corpo e voo para o local do lek (Takata, 2010).

A mistura volátil liberada por machos de *A. fraterculus* é muito complexa e inclui compostos que pertencem a diferentes classes, tais como terpenos, álcoois, aldeídos insaturados, lactonas, e pirazinas (Břízová *et al.* 2013; Cáceres *et al.* 2009; Lima *et al.* 2001) . Em um trabalho anterior, extratos de aeração de machos de *A. fraterculus* (Lima *et al.* 2001)

mostraram-se atraentes para as fêmeas coespecíficas . No entanto, a identidade dos compostos envolvidos na atração de fêmeas permanece ainda desconhecida. Elucidar a identidade dos constituintes do feromônio sexual de *A. fraterculus* é crucial para o desenvolvimento de um controle eficaz contra estas moscas em pomares infestados. No presente estudo, buscou-se identificar compostos em extratos de aeração de machos de *A. fraterculus* envolvidos na atração de fêmeas coespecíficas. Para tanto, foi utilizada a técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada à detecção electroantenográfica (CG-EAG) e cromatografia gasosa bidimensional acoplada a espectrometria de massa (CGxCG-TOF/EM) para detectar e identificar compostos presentes nas amostras de aeração de machos *A. fraterculus* que provocam despolarização da antena nas fêmeas coespecíficas. Além disso, foi realizada uma série de bioensaios em laboratório para testar se uma mistura sintética composta de compostos eletrofisiologicamente atrai fêmeas de *A. fraterculus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de insetos Larvas de uma população selvagem de *A. fraterculus* foram coletadas diretamente de goiabas infestadas que haviam sido colhidas a partir de um pomar localizado na cidade de Coruripe (10°8'1" S, 36°10'34" W), no Estado de Alagoas, Brasil. As larvas foram colocadas para empupação em caixas separadas (44cm x 35cm x 25cm), feitos de isopor, contendo uma mistura de areia lavada e vermiculita. Após 13-15 dias, as moscas adultas (fêmeas e machos) emergiram e foram separadas em gaiolas de vidro (30 cm x 20 cm x 15 cm), mantidas no laboratório de Ecologia Química da Universidade Federal de Alagoas (Maceió, Alagoas, Brasil) sob um fotoperíodo de 14:10 h de luz:escuro à uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $60 \pm 10\%$. As moscas foram alimentadas com uma dieta constituída por uma mistura de açúcar mascavo e levedura de cerveja (3:1), juntamente com a água, em um recipiente separado. A identificação das espécies foi baseada nas características morfológicas do ovipositor da fêmea (Zucchi 2000).

Coleta de compostos voláteis de machos Grupos de 20 machos virgens sexualmente maduros (15-20 dias de idade), de *A. fraterculus*, foram colocados em um dessecador de vidro (180 mm de altura; 200 mm de diâmetro) e, os voláteis emitidos foram coletados por meio da

técnica de *headspace* dinâmico (Aeração). A entrada de um dessecador foi modificada pela adição de um tubo de entrada contendo carvão ativo (100 mg). O ar no interior do dessecador, enriquecido com os voláteis dos machos, foi sugado através de uma bomba de ar (Resun ® AC 2600, 6L/min), acoplado a um medidor de fluxo (Supelco ®) que libera um fluxo constante de 500 ml/min, por 24 horas (das 09h00 às 09h00), o qual é adsorvido no filtro de Tenax ®(100mg). Os voláteis retidos no filtro foram então dissolvidos com 500 µL de hexano grau HPLC redestilado (Sigma-Aldrich). A coleta de voláteis foi conduzida com dez repetições (n = 10). As amostras foram armazenadas em frascos de 2 mL, os quais foram colocadas em freezer para posterior análises químicas e ensaios comportamentais.

Eletrofisiologia Para detectar os compostos a partir das amostras de aeração de machos de *A. fraterculus* que são potencialmente envolvidos na atração de fêmeas coespecíficas, análises eletrofisiológicas foram realizadas em um cromatógrafo gasoso (GC Thermo Ultra, Thermo Scientific, Milão, Itália), equipado com um detector de ionização de chama (DIC) e uma coluna VB-5 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro, 0,25 mm de espessura de película, ValcoBond) e acoplada a uma instalação de EAG (linha de transferência aquecida, o controlador universal de dois canais de aquisição serial bus) fornecida por Synthech (Kirchzarten, Alemanha). O Controle do fluxo eletrônico foi usado para manter um fluxo de gás transportador hélio constante de 1 mL/min. Uma alíquota da amostra de solvente utilizado nas aerações (2 µl) foi injetado no modo de *splitless* com uma temperatura do forno de 40°C e uma temperatura do injetor de 150°C, seguido por abertura de separação da válvula depois de 1 minuto e aumentando a temperatura do forno a uma taxa de 6°C/min até 200°C. A temperatura final foi mantida durante 5 minutos. A coluna foi dividida no final por um separador em dois pedaços de capilares (comprimento 40 cm, e 0,25 milímetros de diâmetro interno). Gás nitrogênio foi adicionado antes da divisão. Um capilar foi levado para a DIC e o outro lado de fora do forno GC, em um tubo de vidro, em que o efluente foi misturado com um fluxo de ar limpo e umidificado e dirigido ao longo da preparação da cabeça. Fêmeas de *A. fraterculus* (10-20 dias de idade, n = 6) foram usadas para as análises. A cabeça de um indivíduo foi retirada do tórax usando micro-tesoura. A base da cabeça e a ponta de uma antena foram montadas entre dois elétrodos de capilares de vidro, as quais foram preenchidas com solução de Ringer (8,0 g/L de NaCl, 0,4 g/L de KCl, 0,4 g/L de CaCl₂) e ligados a fios de prata, fechando um circuito elétrico. O sinal de antena amplificado foi levado para a interface

EAG. Um composto foi considerado como eletrofisiologicamente ativo quando induziu uma resposta de despolarização em, pelo menos, três dos seis réplicas.

Análises por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas Os extratos de aeração de machos de *A. fraterculus* foram analisados em um instrumento LECO Pegasus 4D GC × GC-TOFMS (LECO Corporation, St. Joseph, MI, EUA), equipado com um modulador criogênico. A coluna cromatográfica de primeira dimensão (coluna 1) foi de 250 µm × 30 × 0.25 µm ZB - 5MS (Phenomenex , CA , EUA). A coluna cromatográfica de segunda dimensão (coluna 2) foi de 2m × 100 µm × 0.20 µm RTX -50 (RESTEC, Bellefonte, PA, EUA). O hélio (1ml/min) foi usado como o gás de arraste num modo de fluxo constante . O injetor automático Agilent 7683 (Agilent, Palo, Alto, CA, EUA) injetou 1 µL da amostra no modo de *splitless* numa entrada de 220°C na coluna 1. A coluna 1 foi mantida a 40°C durante 2 min., em seguida, em rampa , a 5 °C/ min. até 270 °C , em seguida a 20 °C/min até 320°C e mantida durante 2 minutos. A temperatura do forno da coluna 2 foi constantemente elevada 10 ° C a mais do que a do forno da coluna 1. A linha de transferência foi de 260°C e o ponto de ajuste de íon - fonte foi de 220°C. A tensão do detector foi 1750 V e a primeira polarização de filamento foi - 70 V. Os espectros de massa foram obtidos a partir de m / z 10 a 600 a 100 espectros/s. Os dados foram processados e visualizados consecutivamente em 2D e 3D utilizando o software de cromatogramas LECO ChromaTOF. Uma série de n-alcanos (C8 - C22; Sigma - Aldrich) foram co-injectados com amostras autênticas, para determinar os seus índices de retenção (RI). Os compostos foram identificados por comparação de seus padrões de massa espectros de fragmentação, tempos de retenção e índices de retenção com os dados publicados anteriormente (Adams 2007; Vanickova et al 2012; Vaničkova 2012; . Břízová et al 2013) e os padrões sintéticos.

Compostos Exceto para os (S, S)-(-)-epianastrefina, que foi fornecida pelo Prof Jim Nation (Universidade da Florida, Gainesville, EUA), todos os compostos sintéticos foram adquiridos da Sigma- Aldrich. As purezas foram > 95 % com base na capilaridade por cromatografia gasosa

Ensaio comportamentais Para testar a capacidade de atração de extratos de aeração de machos para as fêmeas virgens de *A. fraterculus* (15-30 dias de idade), bem como de uma mistura sintética de compostos eletrofisiologicamente ativos, os testes comportamentais foram

realizados numa caixa de vidro (28 cm x 10 cm x 15 cm), utilizado como uma arena de bioensaio. Para cada repetição, três fêmeas virgens foram colocadas na arena de bioensaio. Um tubo tipo *ependorf* contendo uma microesfera de quitosana, 100 µl de extrato de aeração macho, a mistura sintética ou apenas hexano (como um controle), foi colocado na posição central da arena de bioensaio. A mistura sintética foi preparada de acordo com as proporções relativas de cada composto em extratos de aeração de machos. O comportamento exibido pelas fêmeas que se aproximam da *ependorf* foi registrado e caracterizado através da observação direta, realizada por dois observadores, como: (1) TOS (*touching the odor source*), ou seja, fêmeas que tocaram a fonte de odor e (2) UWM (*upwind movement*), ou seja, fêmeas que se moviam ou voavam ao redor da fonte odor demonstrando agitação de asas. Todos os ensaios comportamentais foram realizadas entre 8:00-12:00 com um delineamento experimental inteiramente casualizado, com três tratamentos (1 - extrato de aeração de machos, 2 - a mistura sintética, 3 - hexano) e duas variáveis (TOS e UWM). No total, foram realizadas 10 repetições por tratamento, o tempo de observação para cada repetição foi de 20 min.

Análises Estatísticas. A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias nas respostas de *A. fraterculus* foram verificadas usando os testes de *Liliefors* e *Levene*, respectivamente. Os dados foram transformados para log (x) para atingir a normalidade. A análise de variância (ANOVA, $p \leq 0.05$) foi utilizada para procurar as diferenças nas respostas médias de fêmeas em relação a duas variáveis observadas (TOS e UWM) entre os tratamentos. O teste de *Tukey-HSD* ($p \leq 0.05$) foi utilizado para comparações *a posteriori*. O software utilizado para as análises estatísticas foi o Bioestat 5.0®.

RESULTADOS

As análises por CGxCG-TOF/EM revelaram a presença de 29 compostos nos extratos de aeração de machos de *A. fraterculus*. Os compostos representam uma mistura complexa de diferentes estruturas químicas, incluindo terpenos, álcoois, aldeídos, cetonas e ésteres. Os componentes principais (> 19 %) foram identificados como o limoneno e (*E,E*)- α -farneseno (Tabela 1). Componentes minoritários (1-7%) incluíram 2-hexanona, α -pineno, 2-etil-hexan-1-

ol, *p*-cimeno, indano, (*E*)- β -ocimeno, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol, (*Z,E*)- α -farneseno, suspensolídeo, anastrefina e epianastrefina. Os compostos voláteis restantes apareceram em quantidades traço (<0,1 %), incluindo o (*Z*)-3-nonen-1-ol. A análise de CG-EAG, com as amostras de aeração de machos de *A. fraterculus*, revelou apenas seis compostos nesta mistura complexa provocando despolarização consistente nas antenas de fêmeas coespecíficas (Tabela 2, Figs. 1 e 2). Os compostos responsáveis pela despolarização das antenas foram dois monoterpenos (isto é, α -pineno e limoneno), dois álcoois [(*Z*)-3-nonen-1-ol e (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol], um sesquiterpeno [(*E,E*)- α -farneseno] e uma lactona [(*S,S*)-(-)-epianastrefina]. O último composto provocou a resposta da antena mais forte em fêmeas de *A. fraterculus*.

Os bioensaios mostraram que o extrato de aeração de machos de *A. fraterculus*, bem como a mistura de compostos indutores de despolarização da antena, mediaram respostas comportamentais nas fêmeas coespecíficas. Os extratos de aeração e a mistura de compostos eletrofisiologicamente eliciaram respostas de TOS e UWM em fêmeas de modo semelhante um a outro. No entanto, estes dois tratamentos induziram respostas mais significativamente em fêmeas do que o controle hexano em ambas as modalidades de comportamento medido (Fig. 3).

Figura 1 Cromatograma representando a separação de compostos presentes nos extratos de aeração de *A. fraterculus*.

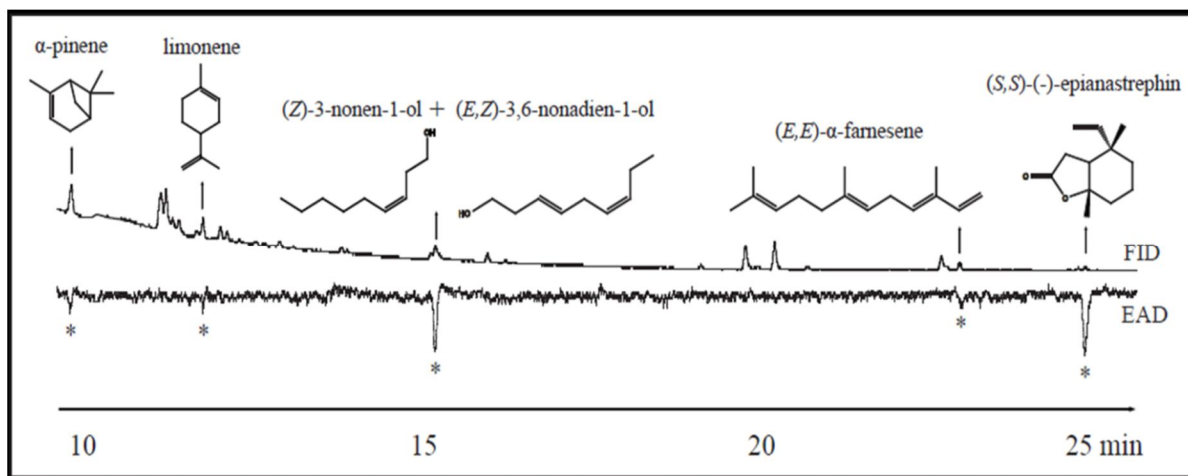


Tabela 1. Compostos químicos (média percentual relativa % \pm desvio padrão relativo) identificados por CG \times CG-TOFEM em extratos de aeração (N=10) de machos em chamamento de *Anastrepha fraterculus*.

No.	Composto	IR ^a	IR ^b _{ref}	Média \pm DP
1	3-Hexanona	791	795	tr
2	2-Hexanona	796	788	2.97 \pm 0.08
3	Hexanal	801	800	0.60 \pm 0.02
4	α -Pineno	938	939	2.13 \pm 0.06
5	Campheno	956	953	tr
6	β -Pineno	985	980	0.79 \pm 0.33
7	Myrceno	991	991	0.43 \pm 0.04
8	Hexanoato de etila	996	996	0.62 \pm 0.08
9	para-Cymeno	1030	1033	4.09 \pm 1.36
10	2-etil-hexan-1-ol	1030	1029	2.10 \pm 0.31
11	Limoneno	1035	1036	44.0 \pm 2.84
12	(Z)- β -Ocimeno	1035	1034	0.81 \pm 0.09
13	5-Etenilididro-5-meil-2(3H)-furanona	1044	-	0.13 \pm 0.02
14	Indano	1046	1048	1.49 \pm 0.53
15	(E)- β -Ocimeno	1049	1060	6.34 \pm 1.15
16	Linalol	1101	1100	tr
17	Câmfora	1141	1143	tr
18	(Z)-3-Nonen-1-ol ^c	1158	1159	tr
19	(E,Z)-3,6-Nonadien-1-ol ^c	1160	1161	1.21 \pm 0.39
20	Acetato de bornila	1299	1291	0.30 \pm 0.06
21	(E)- α -Bergamoteno	1445	1436	0.18 \pm 0.01
22	(Z)- β -Farneseno	1458	1443	0.22 \pm 0.04

23	(Z,E)- α -Farneseno	1492	1495	2.73 \pm 0.70
24	Germacreno D	1502	1499	tr
25	Suspensolideo	1509	1506	1.03 \pm 0.17
26	(E,E)- α -Farneseno ^c	1512	1508	19.47 \pm 1.32
27	oxido de Caryofileno	1606	1606	tr
28	Anastrefina	1610	1617	1.59 \pm 0.04
29	(S,S)-(-)-Epianastrefina	1625	1621	6.33 \pm 1.20

^aIR – Índice de retenção

^bIR_{ref} - Índice de Retenção referencial a partir da literatura (Adams, 2007; Vaníčková et al. 2012; Vaníčková 2012; Břízová et al. 2013)

^cCompostos que eliciaram resposta antenal em fêmeas de *A. fraterculus* coespecíficas

tr – quantidades traço (< 0.1%)

Tabela 2. Compostos EAD-ativos (Média relative percentual \pm Erro padrão) identificado em extratos de aeração (N=10) de machos em chamamento de *Anastrepha fraterculus*.

No	Compostos ^a	IR ^b	TR ^c [1 st dim, 2 nd dim] [s]	Média \pm EP
1	α -Pineno	938	915, 2.16	2.13 \pm 0.06
2	Limoneno	1035	1105, 2.34	44.0 \pm 2.84
3	(Z)-3-Nonen-1-ol	1158	1330, 2.13	tr
4	(E,Z)-3,6-Nonadien-1-ol	1160	1340, 2.87	1.21 \pm 0.39
5	(E,E)- α -Farneseno	1512	1890, 2.52	19.47 \pm 1.32
6	(S,S)-(-)-Epianastrefina	1625	2045, 3.65	6.33 \pm 1.20

^aA identificação é baseada na comparação do espectro de massas e tempo de retenção de materiais naturais com àqueles de padrões autênticos sintéticos.

^bRI – Índice de retenção de compostos identificados por CGxCG-TOFEM na coluna DB-5

^cRT – Tempo de retenção na 1^o e 2^a dimensão

tr – quantidade traço (< 0.1%)

Figura 2 Cromatograma bidimensional obtido de extratos de aeração de machos de *A. fraterculus* onde: α -Pinene (1), limoneno (2), (*Z*)-3-nonen-1-ol (3), (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol (4), (*E,E*)- α -farneseno (5), e (*S,S*)-(-)-epianastrefina (6).

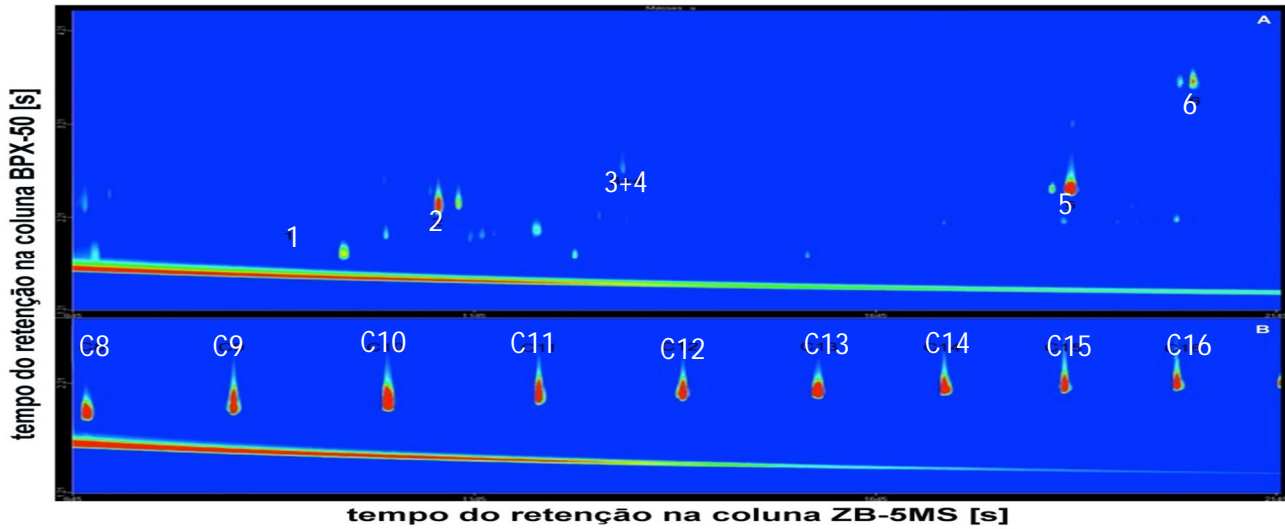
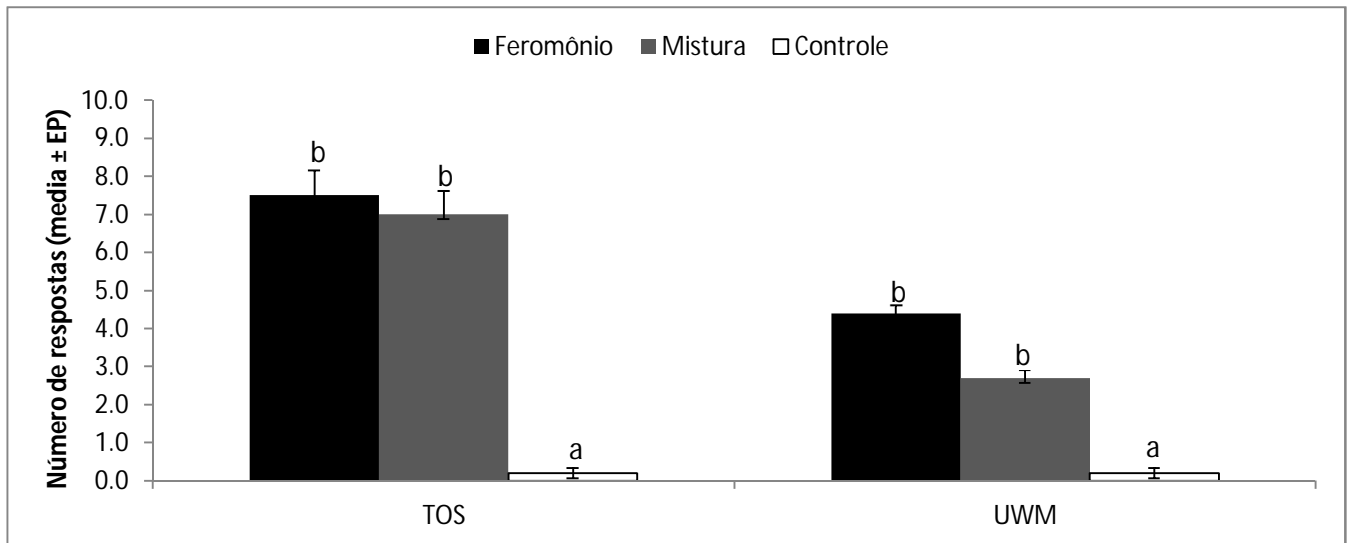


Figura 3 Resposta comportamental de fêmeas de *A. fraterculus* para extratos de aeração de machos coespecíficos (cor preta), a mistura de seis compostos sintéticos: α -pineno, limoneno, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol, (*E,E*)- α -farneseno e (*S,S*)-(-)-epianastrefina (cor cinza) e hexano (controle, cor branca).



Barras com letras diferentes são significativamente diferentes (teste de Tukey Post Hoc HSD, $\alpha < 0,05$). A abreviação da resposta comportamental de fêmeas é demonstrada como TOS: touching the odor source (toque na fonte de odor) e UWM: upwind movement around the odor source (vô em torno da fonte).

DISCUSSÃO

Vários compostos identificados nos extratos de aeração de machos sexualmente maduros de *A. fraterculus* foram previamente relatados como parte da mistura de voláteis de machos de diferentes populações do complexo *fraterculus* (Břízová *et al.* 2013; Cáceres *et al.* 2009; Lima *et al.* 2001) . No entanto, o uso da técnica de CGxCG-TOF/EM, com a sua sensibilidade significativamente maior e uma melhor separação de compostos em co-eluição, permitiu identificar outros componentes em quantidades traço (Zrostlíková *et al.* 2003), os quais não tinham sido previamente relatados para *Anastrepha* spp (Lima- Mendonça *et al.* 2013). De fato, dos 29 compostos aqui identificados, 11 são relatados pela primeira vez como constituintes da mistura volátil emitido por machos de *A. fraterculus* como parte do feromônio sexual de machos desta espécie, são eles: α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, cânfora, acetato de bornila, óxido de cariofileno, 5-etenil-dihydro-5- metil-2(3H)-furanona, 3-hexanona, hexanal, e indano. A maioria destes compostos são também registrados como voláteis de plantas e podem derivar a partir de resíduos da dieta de larvas , como relatado por outras espécies de Tephritidae tais como *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Vanickova 2012; . Vanickova *et al.* 2012)

Os bioensaios mostraram que as amostras da aeração de machos de *A. fraterculus* eliciaram respostas comportamentais maiores em fêmeas do que para o controle hexano, proporcionando uma forte evidência de que a mistura volátil liberada pelos machos, pode incluir componentes que atuam como feromônios sexuais. Com a ajuda da técnica de CG-EAG, foram selecionados os compostos dentro desta complexa mistura que seriam potencialmente envolvidos na atração de fêmeas. Nos bioensaios, a mistura de compostos eletrofisiologicamente ativos mostrou ser tão eficaz quanto os extratos de aeração de machos de *A. fraterculus* e mais eficaz do que o controle hexano em mediar as respostas comportamentais das fêmeas coespecíficas. Isto indica claramente que os compostos dentro desta mistura, ou seja, α -pineno, limoneno, (Z)-3-nonel-1- ol, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol, (E,E)- α -farneseno, e (S,S)-(-)-epianastrefina, são os principais componentes da mistura do feromônio sexual de *A. fraterculus* .

A atratividade de extratos de aeração de machos para fêmeas coespecíficas de espécies de *Anastrepha* já foi demonstrado para outras espécies, como *Anastrepha obliqua*

(Marquart), *Anastrepha suspensa* (Loew, 1862), *Anastrepha ludens* (Loew) e *Anastrepha serpentina* (Wiedemann) (Webb *et al.* 1983; Robacker e Garcia 1990; Robacker *et al.* 2009; López- Guillén *et al.* 2011). Isso indica que a liberação de feromônios sexuais por machos é uma etapa chave para a corte deste gênero como um todo. Curiosamente, com exceção de α -pineno, todos os compostos eletrofisiológicos ativos encontrados em *A. fraterculus* foram previamente identificados na mistura de compostos voláteis liberados por machos de outras três espécies-irmãs, ou seja, *A. suspensa*, *A. ludens* e *A. obliqua*, que foram coletados por meio da técnica de aeração (Robacker e Hart 1985; Robacker e Garcia 1990; Rocca *et al.* 1992; López-Guillén *et al.* 2011). Entre os compostos eletrofisiologicamente ativos, (S,S)-(-)-epianastrefina foi responsável pela forte despolarização da antena em fêmeas de *A. fraterculus*. Este lactona já foi identificada em outras espécies de *Anastrepha*, como *A. ludens* (Robacker e Hart 1985) e *A. suspensa* (Rocca *et al.* 1992), e parece ser um elemento chave no feromônio sexual de algumas espécies deste gênero. Além disso, em fêmeas de *A. ludens*, (S,S)-(-)-epianastrefina também provocou mais forte despolarização da antena entre os compostos testados (Robacker *et al.* 1986). No entanto, ela somente desencadeia respostas comportamentais em fêmeas quando oferecida em combinações binárias com (Z,Z)-3,6-nonadien-1-ol ou (Z)-3-nonen-1-ol (Robacker 1988). Esta atividade sinérgica de compostos podem desempenhar um papel crucial como barreira reprodutiva entre as espécies de *Anastrepha*, uma vez que voláteis liberados por machos de espécies filogeneticamente relacionadas são bastante semelhantes (López- Guillén *et al.* 2011). Assim, uma combinação de compostos, em vez de compostos individuais, pode proporcionar uma mistura padrão espécie-específica, permitindo que as fêmeas reconheçam machos coespecíficos inequivocadamente. Em nosso estudo, testamos todos os compostos eletrofisiologicamente ativos como uma mistura e, por conseguinte, ainda é necessário testar o papel exato de cada composto eletrofisiologicamente ativo como um feromônio sexual, ou seja, se eles também mediam respostas comportamentais nas fêmeas quando oferecidos individualmente ou apenas como uma mistura. Estudos experimentais futuros integrando análises eletrofisiológicas e ensaios comportamentais e testes de atratividade de fêmeas para os voláteis liberados por machos de diferentes espécies pode ajudar a entender o significado de voláteis na evolução do gênero *Anastrepha*.

No presente estudo, foram identificados pela primeira vez os compostos voláteis que podem atuar como feromônios sexuais em *A. fraterculus*. A elucidação dos componentes do feromônio sexual desta espécie representa o primeiro passo para o desenvolvimento de alternativas para um controle de pragas nos pomares infestados. No entanto, nosso estudo foi realizado em condições de laboratório e, conseqüentemente, investigações experimentais futuras testando a atividade dos compostos comportalmente ativos, em condições de campo, ainda são necessárias para estabelecer em que medida estes componentes do feromônio sexual ajudaria a melhorar o controle de *A. fraterculus* em pomares.

REFERENCIAS

Adams RP. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Illinois, USA: Allured Publishing Corporation.

Aluja M. 1994. Binomics and management of *Anastrepha*. Annu. Rev. Entomol. 39:155-178.

Aluja M, Norrbom AL. 2001. Fruit flies (Tephritidae) phylogeny and evolution of behavior. Aluja M, Norrbom AL, editors. Boca Raton: CRC Press LLC.

Břízová R, Mendonca AL, Vaníčková L, Mendonca AL, da Silva CE, Tomčala A, Paranhos BAJ, Dias VS, Joachim-Bravo IS, Hoskovec M and others. 2013. Pheromone analyses of the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex. Florida Entomologist 96:1107-1115.

Cáceres C, Segura DF, Vera MT, Wornoayporn V, Cladera JL, Teal P, Sapountzis P, Bourtzis P, Zacharopoulou A, Robinson AS. 2009. Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera; Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology. Biological Journal of the Linnean Society 97:152-165.

FAOSTAT. <http://faostat.fao.org>, accessed: Dezembro 2010.

Heath RR, Landolt PJ, Robacker DC, Dueben BD, Epsky N. 2000. Sexual pheromone of Tephritidae flies: Clues to unravel phylogeny and behavior. In: Fruit flies (Tephritidae):

Phylogeny and evolution of behavior. Aluja M, Norrbom AL. Eds. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press LLC. pp. 793-809.

Lima IS, House PE, do Nascimento RR. 2001. Volatile substances from male *Anastrepha fraterculus* Wied. (Diptera: Tephritidae): Identification and behavioural activity. Journal of Brazilian Chemical Society 12:196-201.

Lima-Mendonça A, Mendonça AdL, Sant'An AEG, Do Nascimento RR. 2013. Semiochemicals of fruit flies of the genus *Anastrepha*. Quimica Nova.

López-Guillén G, López LC, Malo EA, Rojas JC. 2011. Olfactory responses of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) to volatiles emitted by calling males. Florida Entomologist 94:874-881.

Nascimento AS, Carvalho RS. 2000. Manejo Integrado de Moscas das frutas. In: Moscas das Frutas de importância econômica: Conhecimento básico e aplicado. Malavasi, A. & Zucchi, RA. Eds. Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil: Holos. p.169.

Nation J, L. 1989. The role of pheromones in the mating system of *Anastrepha* fruit flies. In: Robinson AS, Hooper G, editors. Fruit flies: Their biology, natural enemies and control. Amsterdam: Elsevier Science Publisher. pp. 189-205.

Norrbom AL, Korytkowski CA. 2011. New species of and taxonomic notes on *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). Zootaxa. 2740:1-23.

Robacker DC, Aluja M, Cossé AA, Sacchetti P. 2009. Sex pheromone investigation of *Anastrepha serpentina* (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 3:560-566.

Robacker DC, Garcia JA. 1990. Response of laboratory-strain Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens*, to combination of fermenting fruit odor and male-produced pheromone in laboratory bioassays. Journal of Chemical Ecology 16:2027-2038.

Robacker, DC. 1988. Behavioral response of female Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens*, to components of male-produced sex pheromone. Journal of Chemical Ecology 14:1715-1726.

Robacker DC, Chapa BE, Hart WG. 1986. Electroantennograms of Mexican fruit flies to chemicals produced by males. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 40: 123-127.

Robacker DC, Hart WG. 1985. (Z)-3-nonenol, (Z,Z)-3,6-nonadienol and (S,S)-(-)-epianastrephin: male produced pheromones of the Mexican fruit fly. *Entomol. exp. appl.* 39:103-108.

Rocca JR, Nation JL, Strekowski L, Battiste MA. 1992. Comparison of volatiles emitted by male Caribbean and Mexican fruit flies. *Journal of Chemical Ecology* 18:223-244.

Takata, RM. Padrões de emissão acústica em moscas das frutas do gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) e suas implicações no isolamento reprodutivo pré-copulatório. 2010. PhD thesis. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. 94p.

Vaníčková L. 2012. Chemical ecology of fruit flies: Genera *Ceratitis* and *Anastrepha* Prague: Institute of Chemical Technology.

Vaníčková L, do Nascimento RR, Hoskovec M, Ježková Z, Břízová R, Tomčala A, Kalinová B. 2012. Are the wild and laboratory insect populations different in semiochemical emission? The case of medfly sex pheromone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:7168–7176.

Webb JC, Burk T, Sivinski J. 1983. Attraction of female Caribbean fruit-flies, *Anastrepha suspensa* (Diptera, Tephritidae), to the presence of males and males-produced stimuli in field cages. *Annals of Entomological Society of America* 76:996-998.

Zrostlíková J, Hajšlová J, Čajka T. 2003. Evaluation of two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry for the determination of multiple pesticide residues in fruit. *Journal of Chromatography A* 1019(1-2):173-186.

Zucchi RA. 2000. Taxonomia. In *Moscas das frutas de importância econômica: Conhecimento básico e aplicado*. Malavasi, A. & Zucchi, RA. Eds. Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil: Holos. p. 15.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese buscou fornecer informações referentes aos compostos voláteis produzidos por machos de espécies do gênero *Anastrepha*, identificar misturas feromonais produzidas por machos de populações geograficamente distintas da moscas-das-frutas sul americana (*A. fraterculus*), como também, verificar a resposta eletrofisiológica provocada por extratos de machos em fêmeas desta espécie. Dessa forma, pode-se dizer que as interações intraspecíficas evidenciadas nas espécies de *Anastrepha* estudadas são intermediadas por semioquímicos e que as misturas dos seus compostos voláteis é espécie-específica. Por sua vez, as misturas feromonais liberadas pelos machos das populações pertencentes ao complexo AF, investigadas no presente estudo, diferiram qualitativamente e quantitativamente, demonstrando que algumas populações formam grupos distintos e dentre os voláteis emitidos por machos de uma população de *A. fraterculus*, seis compostos eliciaram resposta antenal em fêmeas coespecíficas e mediante bioensaios conduzidos em laboratório foi demonstrado que a mistura destas substâncias eliciam atração em fêmeas de maneira análoga ao extrato de machos coespecíficos, caracterizando a mistura como atraente sexual desta espécie. Entretanto, testes de campo deverão ser conduzidos para demonstrar a atividade da mistura feromonal em condições naturais. Dessa forma, Pode-se dizer que estudos feromonais e comportamentais são imprescindíveis para a compreensão deste complexo fraterculus, de modo que se faz necessário à continuidade dos mesmos, para que possamos reunir informações suficientes que permitam a elaboração de protocolos que auxiliem no diagnóstico das espécies deste complexo.