



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
(RENORBIO)

RITA DE CÁSSIA CORREIA DA SILVA

**Extração e identificação de compostos voláteis de plantas de *Annona muricata* e *Annona squamosa*, em diferentes estágios de maturação, atraentes para a broca dos frutos *Cerconota anonella***

Maceió

2020

RITA DE CÁSSIA CORREIA DA SILVA

**Extração e identificação de compostos voláteis de plantas de *Annona muricata* e *Annona squamosa*, em diferentes estágios de maturação, atraentes para a broca dos frutos *Cerconota anonella***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) da Universidade Federal de Alagoas, para fins de obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ruth Rufino

Maceió  
2020

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

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586e

Silva, Rita de Cássia Correia da.

Extração e identificação de compostos voláteis de plantas de *Annona muricata* e *Annona squamosa*, em diferentes estágios de maturação, atraentes para a broca dos frutos *Cerconota anonella* / Rita de Cássia Correia da Silva. – 2020.

134 f. : il. color.

Orientadora: Ruth Rufino.

Tese (doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2020.

Inclui bibliografias.

Anexos: f. 124-134.

1. Compostos orgânicos voláteis. 2. Anonácea. 3. Lepidópteros. I. Título.

CDU: 661.16

RITA DE CÁSSIA CORREIA DA SILVA

**Extração e identificação de compostos voláteis de plantas de *Annona muricata* e *Annona squamosa*, em diferentes estágios de maturação, atraentes para a broca do fruto *Cerconota annonella***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

Aprovada em: 29/10/2020.

BANCA EXAMINADORA

*Ruth Rufino do Nascimento*

---

Profa. Dra. Ruth Rufino do Nascimento  
Orientadora - Universidade Federal de Alagoas - UFAL

*Domingos Lusitaneu Pier Macuvele*

---

Prof. Dr. Domingos Lusitaneu Pier Macuvele  
Universidade Rovuma, Moçambique - UniRovuma

*Fabiane Caxico de Abreu Galdino*

---

Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino  
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

*Francis Soares Gomes*

---

Prof. Dr. Francis Soares Gomes  
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

*Johnnatan Duarte de Freitas*

---

Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Alagoas - IFAL

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, proteção e por me permitir concluir mais uma etapa em minha caminhada.

Aos meus pais Jorge Correia e Deulza Maria por todo amor, pela educação dada, confiança, estímulo, carinho e apoio em todas as minhas decisões.

A minha irmã Ana Cristina e meu sobrinho Matheus Antônio, presenças constantes em minha vida.

Ao meu amado esposo Leonardo Vieira pela compreensão, carinho, amor e atenção.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ruth Rufino pela orientação no trabalho, confiança, sugestões e todo conhecimento transmitido durante essa jornada, foram de grande contribuição para o meu desenvolvimento profissional.

Ao técnico Joubert de Alencar Gonçalves por toda a ajuda, principalmente nas viagens para aquisição de material biológico, pelos conselhos e companheirismo.

Aos meus amigos de laboratório: Luana Ferreira, Raphael Tavares, Nathaly Aquino, Claudinete Silva, Jéssica Lima, Maxdouglass Santos, Cristiane Canuto e Jeynni Cristine pelo apoio e amizade.

A professora Dra. Adriana Mendonça, pela ajuda na elaboração e revisão do capítulo do e-book.

Ao Professor Dr. Eurico Lemos da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) pela disponibilidade da área de cultivo.

À Professora Dra. Daniela Maria do Amaral Navarro, ao prof. Dr. Paulo Millet Pinheiro e o Técnico Júlio, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pela contribuição neste trabalho, por ter deixado sempre disponível o uso dos equipamentos e outros recursos do Laboratório de ecologia.

Ao Professor Dr. Johnatan Freitas do Instituto Federal de Alagoas (IFAL) pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A professora Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino, pela colaboração com o substrato para testes comportamentais.

A todos que fazem parte do Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos (LTBA) da UFAL, em especial, à Margarete.

Ao Dr. Karlos Ribeiro do Laboratório de Pesquisa de Recursos Naturais (LPqRN) da UFAL, pela ajuda no desenvolvimento da parte de biologia molecular.

Aos professores da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), pelos ensinamentos transmitidos.

As colegas: Ana Alice, Rosane, Ellen, Lívia, Lúcia, Juliane, Glória e Zilmar pela amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio financeiro concedido a realização desta pesquisa.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho. Muito Obrigada!

## RESUMO

A pinheira (*Annona squamosa*) e a gravioleira (*Annona muricata*) apresentam destaque na fruticultura mundial e grande aceitação comercial. Sua produção constitui um importante fator de impacto econômico; entretanto um dos principais obstáculos à exploração econômica destas frutíferas é a existência de um complexo de pragas que atacam estas culturas, tendo como principal praga uma mariposa, a *Cerconota anonella*. O presente estudo objetiva: realizar um levantamento sobre a existência de patentes de semioquímicos de *Annona* utilizadas no controle de pragas; estudar a biologia molecular e identificar as sensilas presentes nas antenas de fêmeas deste inseto; extrair e identificar os compostos voláteis de plantas de *A. muricata* e *A. squamosa* em diferentes estágios de maturação de plantas (vegetativo, florado e frutificado) atraentes a fêmeas de *C. anonella* e estudar o efeito sinérgico do extrato de *A. squamosa* no estágio frutificado com o extrato de glândulas de fêmeas coespecíficas na atração de machos desta espécie. Frutos de graviola brocados foram coletados em pomares do município de Coruripe-AL, para obtenção dos adultos. Os compostos voláteis emitidos por estas plantas foram coletados pela técnica de *headspace* dinâmico. Foram realizadas a extração de DNA, PCR (reação em cadeia da polimerase), sequenciamento, bioensaios comportamentais, as análises utilizando MEV, CG/MS e CG/EAD. Os resultados foram submetidos as análises estatísticas de Wilcoxon ( $p < 0.05$ ). Através da revisão patentária foram constatadas 201 patentes na base PATENTINSPIRATION quando utilizado o termo "*Annona*". Dessas, cinco patentes foram depositadas no Brasil, ocupando o nono lugar no ranking de patentes. Pela biologia molecular foi confirmada a identificação da espécie. As análises de MEV demonstraram uma diversidade de sensilas presentes nas antenas das fêmeas, tais como as sensilas: basicônica, caética, tricóide, dentre outras. Os bioensaios revelaram que o tratamento controle não eliciu atratividade em fêmeas, quando comparado com os tratamentos testados. As fêmeas foram atraídas para plantas antes mesmo da frutificação, incluindo a fase de floração, sendo a fase frutificada a preferencial. Não houve diferenças significativas quando comparados os extratos de plantas nos estágios de maturação preferenciais. Dentre as classes de compostos identificados por CG-EM foram encontrados terpenos, ésteres, álcoois, cetonas e aldeídos. As análises por CG-EAD demonstraram que no extrato frutificado de *A. squamosa* existem quatro compostos bioativos, são eles:  $\beta$ -mirceno,  $\beta$ -ocimeno, benzoato de metila e o linalol. Foi constatado o efeito sinérgico para formulação constituída pela mistura do extrato de *A. squamosa* com o extrato de glândulas de fêmeas coespecíficas na atração de machos virgens de *C. anonella*. Baseado nos resultados obtidos, conclui-se que: *C. anonella* pode estar presente no campo antes da frutificação, que os quimiorreceptores exercem papel fundamental nas escolhas das moléculas por parte destas fêmeas, a revisão patentária demonstrou que as informações acerca da ecologia química de espécies do gênero *Cerconota*, particularmente *C. anonella* ainda são incipientes. Assim o presente trabalho apresenta um estudo mais acurado acerca das interações heteroespecíficas e homoespecíficas entre adultos de *C. anonella* e as plantas de *A. squamosa*.

**Palavras-chave:** Compostos voláteis, Anonaceae, Lepidoptera.

## ABSTRACT

Custard apple (*Annona squamosa*) and soursop (*Annona muricata*) stand out in fruit farming in several parts of the world and have great commercial acceptance. The production of these fruits constitutes an important factor of economic impact; however, one of the main obstacles to the economic exploitation of these fruit trees is the existence of a complex of pests that attack these cultures, such as the fruit borer (*Cerconota anonella*), which is the main pest causing this problem. Thus, this study aimed to carry out a survey on patents referring to *Annona* semiochemicals used in pest control, analyze the molecular biology of *C. anonella* and identify the sensilla which binds to odorant molecules in the female antennae of this insect species, as well as to extract and identify the volatile compounds of *A. muricata* and *A. squamosa* plants at different maturation stages (vegetative, flowering and fruiting) that attract the fruit borer insect. Infested soursops were collected from orchards in the estate of Coruripe, Alagoas State, Brazil, to obtain adults. The volatile compounds emitted by the studied plants were collected through the dynamic headspace technique. DNA extraction, PCR (Polymerase Chain Reaction), sequencing, SEM, GC-MS and GC-EAD were also performed. The data from bioassays were subjected to statistical analysis using the Wilcoxon test ( $p < 0.05$ ). A total of 201 patents were found on the PATENTINSPIRATION database where the term "*Annona*" was used. Brazil ranks eleventh with five patents. The molecular biology analysis confirmed the identification of the species and the SEM analysis identified a diversity of sensilla in the antennae of the *C. anonella* female insects (basiconic, chaetic trichoid, among others). The bioassays revealed that the control treatment did not elicit any attraction on females when compared to all treatments tested. Females were attracted to plants even before fruiting, including the flowering stage. However, the fruiting was the preferred stage. There were no significant differences when comparing the extracts of plants at the preferred stages of maturation. Terpenes, esters, alcohols, ketones, aldehydes were the classes of compounds identified by GC-MS. Four bioactive compounds, namely:  $\beta$ -mycrene,  $\beta$ -ocimene, methyl benzoate and linalool, present in the fruiting stage of *A. squamosa* were identified. The synergistic effect for the formulation of the mixture containing the extract of *A. squamosa* in the fruiting stage with the extract of sex pheromone glands of conspecific females was proven. This finding suggests that the pest may be in the field before fruiting and that chemoreceptors play a fundamental role in the choice of the molecules by *C. anonella* females. The patent review showed that information about the chemical ecology of species of the genus *Cerconota*, particularly *C. anonella*, is still incipient. Thus, the present work presents a more accurate study about the heterospecific and homospecific interactions between adults of *C. anonella* and the plants of *A. squamosa*.

**Keywords:** Volatiles compounds, Anonaceae, Lepidoptera



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Principais países produtores de anonáceas .....	18
Figura 2- Pinheira ( <i>Annona squamosa</i> L.).....	19
Figura 3- Gravioleira ( <i>Annona muricata</i> L.).....	22
Figura 4- Insetos adultos de <i>Cerconota anonella</i> .....	23
Figura 5- Ciclo de vida da <i>C. anonella</i> . . . . .	24
Figura 6 - Representação esquemática dos semioquímicos e suas principais subclasses .....	26
Figura 7 - Esquema do comportamento reprodutivo de <i>C. anonella</i> .....	27
Figura 8 - Diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás típico.....	32
Figura 9- Diagrama de blocos de um espectrômetro de massas .....	33
Figura 10- Esquema de um CG-EAG .....	33

### **Capítulo I - O USO DE SEMIOQUÍMICOS DE *Annona* COMO ATRAENTE NO MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS: UM ESTUDO PROSPECTIVO**

Figura 1- Evolução do número de depósitos de patentes relacionadas as espécies de <i>Annona</i> no mundo .....	47
Figura 2- Principais depositantes . . . . .	48
Figura 3- Quantidade de publicações de acordo com a classificação IPC s .....	49
Figura 4- Distribuição dos resultados da pesquisa por conceitos .....	49
Figura 5- Perfil de publicações de artigos científicos por ano nas bases Scopus e Science Direct. ....	50
Figura 6- Ranking de países e publicação de artigos científicos na base Scopus. ....	51

### **Capítulo II - BIOLOGIA MOLECULAR E ANÁLISE DAS SENSILAS ANTENAS DE *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Depressariidae)**

Figura 1- Localização de Pindorama- Coruripe .....	59
Figura 2- Obtenção e manutenção dos insetos.....	59

Figura 3- Árvore filogenética de inferência Bayesiana com base nas sequências combinadas das regiões COIa e COIb. utilizando <i>Caligo Brasiliensis Sulanu</i> como outgroup .	64
Figura 4- Árvore filogenética de inferência Bayesiana com base nas sequências combinadas das regiões COIa e COIb. utilizando <i>Diatraea_saccharalis</i> como outgroup	65
Figura 5- Micrografia mostrando a diferenciação de fêmeas e machos de <i>C. anonella</i> .	67
Figura 6- Descrição geral para as antenas de fêmeas de <i>C. anonella</i> .	68
Figura 7- Sensilas presentes nas antenas de fêmeas de <i>C. anonella</i> .	69
<b>Capítulo III - FORMULAÇÃO, EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE PLANTAS DE <i>Annona muricata</i> E <i>Annona squamosa</i></b>	
Figura 1- Localização para obtenção da <i>A. muricata</i>	80
Figura 2- Localização para obtenção da <i>A. squamosa</i>	80
Figura 3- Sistema de aeração.	82
Figura 4- Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas	83
Figura 5- Cromatógrafo gasoso acoplado a eletroanténógrafo	84
Figura 6- Esquema do sistema de bioensaio	86
Figura 7- Atratividade de fêmeas para extratos de pinheira e hexano	88
Figura 8- Atratividade preferencial de fêmeas para extratos de pinheira em diferentes estágios	89
Figura 9 - Atratividade de fêmeas para extratos de gravioleira e hexano	90
Figura 10 - Atratividade preferencial de fêmeas para extratos de gravioleira em diferentes estágios	90
Figura 11 - Atratividade preferencial de fêmeas para extratos de e pinheira gravioleira.	91
Figura 12- Principais classes químicas de compostos encontradas nos extratos de plantas de <i>A. squamosa</i>	94

Figura 13- Principais classes químicas de compostos encontradas nos extratos de plantas de <i>A. muricata</i> .....	96
Figura 14 – Análise de CG/EAD dos extratos de <i>A. squamosa</i> no estágio Frutificado .....	99
Figura 15 - Compostos identificados como EADs ativos .....	99
Figura 16 - Atratividade de fêmeas acasaladas de <i>C. anonella</i> para as misturas (Concentração: 1µL/mL) frente ao extrato da planta de pinha no estágio frutificado.....	100
Figura 17 - Atratividade de fêmeas acasaladas de <i>C. anonella</i> para as misturas (Concentração: 1µL/mL) frente ao extrato da planta de pinha no estágio frutificado.....	101
<b>Capítulo IV - FORMULAÇÃO EFICAZ NA ATRAÇÃO DE MACHOS VIRGENS DE <i>C. anonella</i>, BASEADA NA COMBINAÇÃO SINÉRGICA DE EXTRATOS DE PLANTAS FRUTIFICADAS DE <i>Annona squamosa</i> COM O FEROMÔNIO SEXUAL DE FÊMEAS DE <i>C. anonella</i></b>	
Figura 1 - Esquema da interação de <i>C. anonella</i> pelos semioquímicos .....	109
Figura 3 - Fluxograma para a obtenção dos extratos de glândulas produtoras de feromônio sexual .....	113
Figura 3 - Atratividade machos para extratos de pinheira, feromônio, mistura (extratos de pinheira + feromônio) e o hexano .....	116
Figura 4 - Atratividade preferencial de machos para extratos de pinheira, feromônio e mistura (extratos de pinheira + feromônio). .....	116

## LISTA DE TABELAS

### **Capítulo I - O USO DE SEMIOQUÍMICOS DE *Annonas* COMO ATRAENTE NO MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS: UM ESTUDO PROSPECTIVO**

Tabela 1- Palavras chaves utilizadas na busca de patentes e artigos. ....45

Tabela 2- Resultados das buscas nas bases PatentInspiration, INPI, WIPO, Scopus e Scienc Direct.....46

### **Capítulo II - BIOLOGIA MOLECULAR E ANÁLISE DAS SENSILAS ANTENAS DE *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Depressariidae)**

Tabela 1- Números de acesso GenBank das sequências de *Cerconota anonella* utilizadas nas análises filogenéticas .....61

### **Capítulo III - EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE PLANTAS DE *Annona muricata* e *Annona squamosa***

Tabela 1- Formulações de compostos EAD ativos no extrato de planta de pinha no estágio frutificado, nas concentrações de 1 e 10 µL/mL .....87

Tabela 2- Identificação dos compostos em extratos de *A. squamosa*.....93

Tabela 2- Identificação dos compostos em extratos de *A. muricata* .....95

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 REFERÊNCIAS .....	16
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1 Cultura das anonáceas .....	18
2.1.1 A cultura da Pinheira .....	19
2.1.2 A cultura da Gravioleira .....	21
2.2 Cerconota anonella .....	23
2.3 Métodos de controle .....	25
2.4 A comunicação química mediada por semioquímicos .....	26
2.5 Interação planta-hospedeiro e biosensores naturais .....	28
2.6 Microscopia eletrônica de varredura: Identificação e caracterização .....	29
2.7 Análise molecular .....	29
2.8 Extração e identificação de voláteis .....	31
2.8.1 Técnica de extração - Aeração .....	31
2.8.2 Técnicas de identificação de compostos voláteis .....	31
2.9 Bioensaios comportamentais e eletrofisiológico .....	34
2.10 REFERÊNCIAS .....	35
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	40
3.1 Objetivo geral .....	40
3.2 Objetivos específicos .....	40
<b>4 CAPÍTULO I - O USO DE SEMIOQUÍMICO NO ANNONA COMO ATRAENTE NO MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS: UM ESTUDO PROPECTIVO</b> .....	41
4.1 INTRODUÇÃO .....	43
4.2 METODOLOGIA .....	45
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	45

4.4 CONCLUSSÕES.....	51
4.5 REFERÊNCIAS.....	52
<b>5 CAPÍTULO II - BIOLOGIA MOLECULAR E ANÁLISE DAS SENSILAS ANTENAS DE <i>Cerconota anonella</i></b> .....	<b>54</b>
5.1 INTRODUÇÃO .....	56
5.2 METODOLOGIA.....	58
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	62
5.4 CONCLUSSÕES.....	72
5.5 REFERÊNCIAS.....	72
<b>6 CAPITULO III – EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE PLANTAS DE <i>Annona muricata</i> E <i>Annona squamosa</i>, EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO, ATRAENTES PARA A BROCA DO FRUTO <i>Cerconota anonella</i></b> .....	<b>76</b>
6.1 INTRODUÇÃO .....	78
6.2 METODOLOGIA.....	79
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	87
6.4 CONCLUSÕES .....	102
6.5 REFERÊNCIAS.....	103
<b>6 CAPITULO IV – FORMULAÇÃO EFICAZ NA ATRAÇÃO DE MACHOS VIRGENS DE <i>C. anonella</i>, BASEADA NA COMBINAÇÃO SINÉRGICA DE EXTRATOS DE PLANTAS FRUTIFICADAS DE <i>Annona squamosa</i> COM O FEROMÔNIO SEXUAL DE FÊMEAS DE <i>C.anonella</i></b> .....	<b>106</b>
7.1 INTRODUÇÃO .....	108
7.2 METODOLOGIA.....	110
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	115
7.4 CONCLUSSÕES.....	119
7.5 REFERÊNCIAS.....	119
<b>8 CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>122</b>
<b>9 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>123</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil destaca-se em nível mundial quanto a produção e exportação de frutas, já nos três primeiros meses de 2020 exportou mais de 234 mil toneladas de frutas segundo a ABRAFRUTAS (2020). Neste contexto podemos citar a pinheira (*Annona squamosa*) e a gravioleira (*Annona muricata*) que são frutíferas tropicais de grande aceitação comercial, sendo amplamente cultivadas em diversas regiões do Brasil (BRAGA SOBRINHO, 2014).

As principais pragas que afetam estas anonáceas são: *Cerconota anonella* (broca do fruto), *Bephratelloides pomorum* (broca da semente), *Cratossomos* (broca do tronco), *Philonis* (broca do ponteiro dos ramos) e as cochonilhas (SÃO JOSÉ, 2003; BRAGA SOBRINHO, 2010; HERNÁNDEZ *et al.*, 2018). Além disso, as principais doenças enfrentadas por esta cultura, de maior importância nas áreas produtoras do Brasil, são causadas por fungos durante o florescimento e a frutificação.

A mariposa *Cerconota anonella*, (Sepp.1830) (Lepidoptera: Depressaridae) é considerada uma praga de importância econômica que mais prejudica o cultivo das plantas de *A. squamosa* e *A. muricata*, devido os danos causados sobre os frutos (MICHELETTI *et al.*, 2001; BRITO, 2010; PIRES *et al.*, 2016). Os sinais de ataque dessa praga no campo, distinguem-se por botões florais secos e frutos retorcidos com manchas escuras e irregulares (SILVA, 2004).

Tratamentos físicos (ensacamento dos frutos), químicos (uso de inseticidas) e biológicos (utilizando parasitóides) têm sido empregados nos plantios de pinha e de graviola, visando senão controlar, ao menos minimizar a ação da praga *C. anonella* (MICHELETTI, 2000; SILVA 2004; SILVA *et al.*, 2014; SILVA; BROGLIO, 2019).

Outros produtos químicos que não os inseticidas podem ser usados para combater insetos através da manipulação de comportamentos olfativos específicos, aproveitando a existência de compostos naturais usados para a comunicação entre organismos, os semioquímicos (PICKETT *et al.*, 1997; NAVARRO-SILVA; MARQUES; DUQUE, 2009).



Estas substâncias, denominadas semioquímicos, são muitas vezes derivadas de metabólitos de plantas, os quais podem atrair, repelir e fornecer outros tipos de informação a outras espécies (GOMES *et al.*, 2019).

As plantas floradas produzem e emitem uma infinidade de compostos orgânicos voláteis. Em geral, acredita-se que essa emissão tenha atuado principalmente como defesa e, secundariamente, durante o processo evolutivo, para atrair polinizadores, especialmente insetos (BERGSTROM, 2008). A utilização dos compostos orgânicos voláteis (COV's) de plantas constitui uma possível alternativa para o controle de pragas e conservação ambiental.

O sistema de comunicação olfativa dos insetos permite distinguir os compostos orgânicos presentes nos ambientes, induzindo o inseto a exibir uma série de comportamentos específicos, tais como: busca pelas plantas hospedeiras, seleção de locais de oviposição, etc. (SPATHE *et al.*, 2013; HAO; SUN; LIU, 2020).

A antena, o principal órgão sensorial dos insetos, é constituída por diferentes tipos de sensilas. Possui funções como a detecção de sinais químicos, movimento, umidade e temperatura (YUVARAJ *et al.*, 2018; SU *et al.*, 2009).

Pelo exposto, considerando que a cultura das anonáceas é importante pela quantidade do alimento produzido e pela qualidade do produto colhido. O presente estudo objetiva verificar a preferência da praga *Cerconota anonella* por diferentes estágios da planta de pinha e graviola, visando elucidar o estágio para o qual a praga é mais atraída; identificar quais compostos químicos voláteis atraem o lepidóptero em questão, desenvolver formulações contendo os compostos individuais que eliciaram resposta nas antenas de fêmeas e suas respectivas misturas, em diferentes combinações, para emprego em ensaios comportamentais que serão conduzidos em laboratório, fazer o registro da espécie em base de dados molecular e analisar quais sensilas estão presentes nas antenas de fêmeas desta espécie visto que, até o presente momento não existem estudos sobre a influência dos COVs de plantas de *A. muricata* e *A. squamosa* na atração desta espécie nem a identificação de suas sensilas e registro molecular brasileiro.

A presente tese está estruturada em quatro capítulos como segue:

Capítulo I – O uso de semioquímicos de *Annona* como atraente no manejo integrado de pragas: Um estudo prospectivo. Neste capítulo, foi realizada uma prospecção tecnológica para avaliar o uso de semioquímicos de *Annona* para obter uma formulação cairomonal a ser empregado no manejo integrado de pragas. Patentes e artigos científicos foram buscados nas bases PATENTINSPIRATION, WIPO, INTI, Science Direct e Scopus, a fim de fazer um levantamento sobre o cenário atual desse tema. A falta de informações em relação a biologia a nível genético e as ultraestruturas desta espécie, foram bases para a elaboração do capítulo II.

Capítulo II – Biologia molecular e análise das sensilas antenais de *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Depressariidae). No capítulo II, foram executados dois estudos: a extração do DNA do inseto a fim de fazer um comparativo das sequências obtidas com as depositadas no Bold Systems e Gen Bank e a análise das estruturas sensoriais presentes nas antenas da *Cerconota anonella*, identificando os diferentes tipos de sensilas, corroborando respectivamente para a identificação específica deste lepidóptero e entendimento dos tipos e funções das sensilas, visto que estas são essenciais na detecção dos compostos orgânicos voláteis que são de vital importância para a sobrevivência da espécie, como será abordado no capítulo III.

Capítulo III - Extração e identificação de compostos voláteis de plantas de *Annona muricata* e *Annona squamosa*, em diferentes estágios de maturação, atraentes para a broca dos frutos *Cerconota anonella*. O presente capítulo aborda os bioensaios de atratividade preferencial da *C. anonella* aos diferentes estágios de maturação das plantas de *Annona muricata* e *Annona squamosa*, a extração e identificação dos compostos voláteis presentes nesses estágios e os eletrofisiologicamente ativos e a ação das formulações destes em biosensaios de laboratório. Diante dos resultados obtidos com os extratos das plantas foi feito um estudo da eficácia destes com os extratos de feromônio, dando origem ao capítulo IV.

Capítulo IV – Formulação eficaz na atração de machos virgens de *C. anonella*, baseada na combinação sinérgica de extratos de plantas frutificadas de *Annona squamosa* com o feromônio sexual de fêmeas de *C. anonella*. O presente capítulo tem por objetivo a preparação de uma formulação a base da mistura do extrato hexânico dos constituintes voláteis liberados por plantas

frutificadas de pinha (*Annona squamosa*) e do feromônio sexual de fêmeas virgens de *C. anonella* com efeito sinérgico na atração de machos da broca do fruto das anonáceas.

## 1.1 REFERÊNCIAS

ABRAFRUTAS. **Estatísticas de exportações de frutas 2017**, Disponível em <<https://abrafrutas.org/dados-estatisticos/>> acesso em Jul 2020.

BERGSTRÖM, L. G. W. Chemical communication by behaviour-guiding olfactory signals. **Chemical Communications**, n. 34, p. 3959-3979, 2008.

BRAGA SOBRINHO, Raimundo. Integrated production of Annonaceae in Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. SPE1, p. 102-107, 2014.

BRAGA SOBRINHO, R. Potencial de exploração de anonáceas no Nordeste do Brasil. In: Semana Internacional da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria, 17ª, 2010, Fortaleza. **Frutal 2010**. Fortaleza: Embrapa 2010. Disponível em: <[http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo\\_3425.pdf](http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_3425.pdf)> Acesso em: 10 fev. 2019.

BRITO, E. A. **Flutuação populacional e avaliação de táticas de controle sobre a broca-do-fruto das anonáceas *Cerconota anonella* (Lepidoptera: oecophoridae)**. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.

GOMES, Guilherme *et al.* A Neurociência da percepção do Ambiente: estudos e aplicações. <[https://www.researchgate.net/profile/Guilherme\\_Gomes3/publication/323879448\\_A\\_Neurociencia\\_da\\_percepcao\\_do\\_ambiente\\_estudos\\_e\\_aplicacoes/links/5ab1003faca2721710febe1f/A-Neurociencia-da-percepcao-do-ambiente-estudos-e-aplicacoes.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Guilherme_Gomes3/publication/323879448_A_Neurociencia_da_percepcao_do_ambiente_estudos_e_aplicacoes/links/5ab1003faca2721710febe1f/A-Neurociencia-da-percepcao-do-ambiente-estudos-e-aplicacoes.pdf)> Acessado em 10 de maio de 2019.

MICHELETTI, S. M. F. B. *et al.* Controle de *Cerconotaanonella* (Sepp.; 1830) (Lepidoptera: Oecophoridae) e de *Bephratelloidespomorum* (Fab.) (HYM.: Eurytomidae) em frutos de graviola (*Annonamuricata*L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal SP, vol. 23, n. 03, 722-725, 2001.

NAVARRO-SILVA, M. A.; MARQUES, F. A.; DUQUE L. J. E. **Revisão dos semioquímicos que mediam a oviposição em mosquitos: uma possível ferramenta sustentável para o monitoramento e controle de Culicidae**. *Rev. Bras. entomol.* [online]. 2009, vol.53, n.1, pp.1-6. ISSN 1806-9665.

PICKETT, J. A.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. Developing sustainable pest control from chemical ecology. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 64, n. 2, p. 149-156, 1997.

PIRES, E. V. *et al.* Identification and field and laboratory tests of the sex pheromone of *Cerconota anonella* Sepp. (Lepidoptera: Oecophoridae). **Journal of Applied Entomology** (1986), v. 140, p. n/a-n/a, 2015.

YUVARAJ, Jothi Kumar et al. Diversity of olfactory structures: A comparative study of antennal sensilla in Trichoptera and Lepidoptera. **Micron**, v. 111, p. 9-18, 2018.

SÃO JOSÉ, A. R. **Cultivo e mercado da graviola**. Fortaleza: Instituto Frutal, 2003. 36 p.

SILVA, E. L. **Estudo das interações intra- e interespecíficas das pragas das anonáceas, *Bephratelloides pomorum* Fab. (Hymenoptera: Eurytomidae) e *Cerconota Anonella* Sepp. (Lepidoptera: Oecophoridae) e da cana-de-açúcar, *Diatreasaccaralis* Fab. (Lepidoptera: Cambridae) com seus Hospedeiros**. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia- Ecologia química) – Departamento de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas. 2004.

SILVA, L. S. *et al.* Controle de *Cerconota anonella* (Sepp.) (Lep.: Oecophoridae) e de *Bephratelloides pomorum* (Fab.) (Hym.: Eurytomidae) em frutos de pinha (*Annonas quamosa* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.36, edição especial, p.305-309, 2014.

SILVA, L. S.; BROGLIO, S. M. F. **CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E INCIDÊNCIA DE *Cerconota anonella* (LEP.: OECOPHORIDAE) E *Bephratelloides pomorum* (HYM.: EURYTOMIDAE) EM FRUTOS DE PINHEIRA ENSACADOS E CULTIVADOS EM ALAGOAS** Revista Mirante, Anápolis (GO), v. 12, n. 1, jun. 2019. ISSN 1981-4089.

SPÄTTHE, A. *et al.* Plant species-and status-specific odorant blends guide oviposition choice in the moth *Manduca sexta*. **Chemical senses**, v. 38, n. 2, p. 147-159, 2013.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

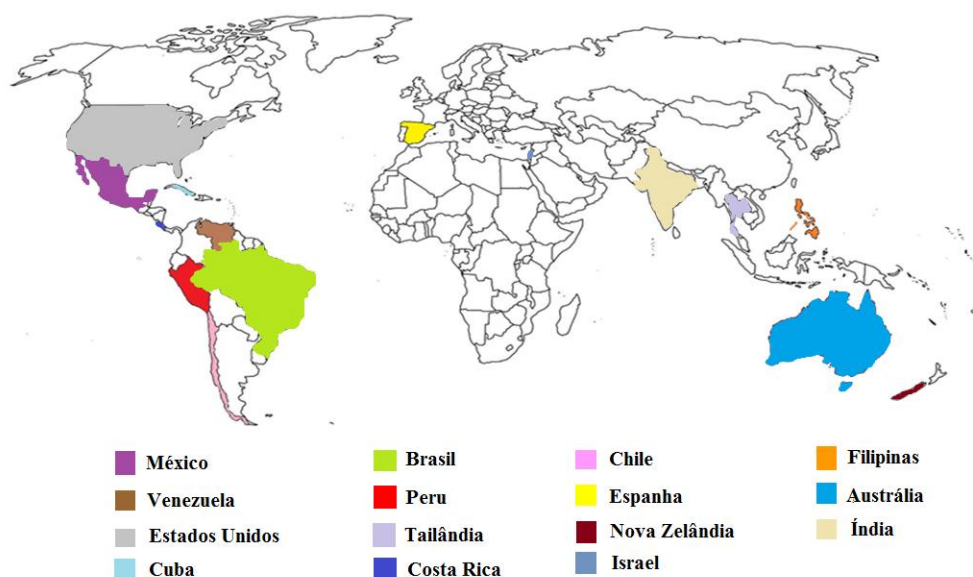
### 2.1 Cultura das anonáceas

A família Annonaceae engloba aproximadamente 120 gêneros e mais de 2.300 espécies, contendo um grupo de plantas que se destacam mundialmente por produzir frutos de alto valor comercial tanto para o mercado *in natura* ou processado, como para a produção de compostos bioativos (BRAGA SOBRINHO, 2014; OLIVEIRA, 2017; TEXEIRA 2020).

Dentre as anonáceas, três gêneros são importantes: *Rollinia* sp, *Albernonoa* sp e *Annona* sp. As principais espécies cultivadas são: *Rollinia silvatica* (araticum-do-mato), *Rollinia mucosa* (biribá), *Rollinia escaibida* (araticum ou quaresma), *Albernonoa purpuracea* (marolo), *Albernonoa lanceolata* (pindaíba) e *Annona muricata* (graviola), *Annona squamosa* (pinha) e *Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L. (atemóia) (MOSCA *et al.*, 2006).

Os principais países produtores no mercado das anonáceas são: Austrália, Chile, Espanha, Estados Unidos, Nova Zelândia e Israel, para a cherimóia; México, Brasil, Venezuela e Costa Rica, para a graviola; e Tailândia, Filipinas, Brasil, Cuba e Índia, para a pinha (SÃO JOSÉ *et al.*, 2014, PEREIRA *et al.*, 2019), conforme mostra a **Figura 1**.

**Figura 1-** Principais países produtores de anonáceas.



Fonte: Autor, 2020

No Brasil, três principais espécies de Annonaceae são produzidas devido a sua importância econômica: graviola (*Annona muricata* L.), pinha (*Annona squamosa* L.) e mais recentemente, têm-se expandido os cultivos de atemóia (*Annona cherimola* Mill × *Annona squamosa* L.), que são espécies introduzidas no país em meados da década de 1980 (SÃO JOSÉ *et al.*, 2014). Os principais estados do nordeste brasileiro que se destacam pela produção de anonáceas são: Bahia, Alagoas e Pernambuco (BRAGA SOBRINHO, 2014).

### 2.1.1 A Cultura da Pinheira

A pinheira (**Figura 2**) é uma planta originária, possivelmente, das terras baixas da América Central, mais precisamente da Ilha Trinidad Tobago nas Antilhas. Foi introduzida no Brasil, no ano de 1626 pelo Conde de Miranda, originando-se daí a denominação vulgar de fruta-do-conde (ARAÚJO, 2007; PEREIRA, 2011; BRAGA SOBRINHO, 2014). A fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.) é conhecida por diversas denominações: ata, pinha, rinon, sugar-apple (MARTELLETO; IDE, 2008).

**Figura 2-** Pinheira (*Annona squamosa* L.).



Fonte: Autor, 2019.

É uma planta de porte baixo, muito ramificada, as folhas têm forte tonalidade verde-brilhante. Exibe os órgãos sexuais masculino e feminino na mesma flor, sendo, portanto, hermafrodita e caracteriza-se por apresentar dicogamia protogínica, limitando assim a autofecundação (SANTOS, 2005). Os

frutos apresentam coloração esverdeada, forma arredondada, formado por muitos carpelos, onde se originam cada semente. Sua polpa é branca, doce, de odor suave, rica em sais minerais e vitaminas (CORDEIRO *et al.*, 2000).

A polinização deve ser feita manualmente (técnica conhecida como polinização artificial), visando obter o maior número possível de frutos bem formados. No período de maturação, as anteras (órgão masculino) abrem-se liberando os grãos de pólen que serão transferidos (polinização) para o estigma (órgão feminino), facilitando, assim, a fecundação (ARAÚJO FILHO *et al.*, 1998). O plantio deve ser realizado preferencialmente no início da estação chuvosa, mantida livre da concorrência de ervas daninhas para evitar a competição por água e nutrientes (ARAÚJO FILHO *et al.*, 1998).

De acordo com Censo Agropecuário (2017) a região Nordeste é a principal produtora de pinha com mais de 97% de toda a área cultivada no Brasil. A produção brasileira chegou a mais de 8,7 mil toneladas, e o valor de produção ultrapassou R\$ 20 milhões (IBGE, 2019).

O estado da Bahia destaca-se como o principal produtor, sendo considerado o maior produtor nacional de pinha (com produção durante todo o ano) e graviola (IBGE, 2019).

Não é somente a quantidade do alimento produzido que interessa; as características físico-químicas (qualidade) do produto colhido também são importantes. A qualidade biológica dos alimentos está em seus nutrientes e dois aspectos importantes devem ser considerados pela agricultura: a produção de plantas saudáveis e a obtenção de alimentos sem agentes químicos potencialmente danosos ao homem e ao ambiente.

A produção desta planta vem passando por algumas limitações devido a ocorrência de plantas infestantes nas estrelinhas da área, em virtude da competição por água, luz e nutrientes, elementos estes essenciais para o desenvolvimento da frutífera (DA SILVA *et al.*, 2020).

O estudo conduzido por Da Silva e colaboradores (2020) em pomar de pinha situado na localidade do município de Rio Largo-AL, mostraram a ocorrência de 17 espécies pertencente em sua maioria às famílias Asteraceae, Euphorbiaceae e Poaceae.

Outros prejuízos também afetam esta frutífera, como diversas doenças e um complexo de pragas sobre as anonáceas, influenciam diretamente em sua comercialização e produção (ARAÚJO, 2007).

Entre as principais doenças e pragas da pinha estão: a antracnose, a podridão-das-raízes, a pinha preta, a podridão-da-seca, a broca do tronco (*Cratosomos sp.*), a broca dos frutos (*Cerconota anonella*). Sendo esta última à praga mais agravante, para combate dos agricultores, fator que vêm desestimulando o estabelecimento de plantios comerciais (MARTELLETO; IDE, 2008).

Os frutos pequenos de *A. squamosa* quando atacados pelas *C. anonella*, secam ficando a parte atacada endurecida e enegrecida (SILVA *et al.*, 2017).

De forma generalizada, as pragas constituem-se em um dos fatores limitantes à exploração racional de muitos agroecossistemas, provocando grandes perdas na produção (MACEDO *et al.*, 2007). Entre as pragas citadas, o trabalho destaca a Ordem Lepidoptera, a qual constitui a ordem de maior número de insetos pragas de nossa agricultura. As mariposas representam a grande maioria dos insetos desta ordem, com cerca de 127.000 (87%) espécies descritas, distribuídas em 25 famílias. Suas formas larvais são muito prejudiciais, atacando todas as partes das plantas e causando enormes prejuízos (SACKIS; MORAIS, 2008).

### **2.1.2 A Cultura da Gravioleira**

A gravioleira (*Annona muricata* L.) é uma frutífera tropical, nativa da América Central e norte da América do Sul é distribuída e cultivada comercialmente em climas tropicais e subtropicais em todo mundo. A Venezuela, maior país produtor desta fruta na América do Sul, possui áreas plantadas com gravioleiras, superior a mil hectares (JUNQUEIRA *et al.*, 1996; ANAYA; MONTALVO-GONZÁLEZ, 2020).

Pertencente à família Annonaceae, vem sendo cultivada no Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do país (JUNQUEIRA *et al.*, 1996). Vulgarmente, a gravioleira é conhecida como jaca-de-pobre, jaca-do-Pará, coração-de-rainha, *soursop*, araticum manso, *guanabána* (MELO, 2006; ARÔXA *et al.*, 2020).



Planta (**Figura 3**) perene, ereta, com altura variando de 5 a 8 m (dependendo de fatores como clima, solo e manejo da cultura), sua raiz não é tão vigorosa e profunda quanto a de outras fruteiras tropicais. Possui hábito de crescimento ereto e flores hermafrodita (MELO, 2006; CRISÓSTOMO; NAUMOV, 2009; MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2015). O fruto é uma baga composta, seu formato varia em função dos óvulos que não foram fecundados, a casca que é verde-escuro quando os frutos estão imaturos é verde-clara quando no ponto de colheita. A polpa é branca e se assemelha a algodão umedecido, fibrosa, muito sucosa e subácida com sabor e odor acentuados. As sementes têm cor geralmente preta, quando são retiradas do fruto, ficando com coloração marrom-escuro a marrom-claro ou castanho após alguns dias fora deste (SANTOS FILHO, 2007; ARÔXA *et al.*, 2020).

**Figura 3-** Gravioleira (*Annona muricata* L.).



Fonte: Autor, 2019.

No Brasil, a graviola ocupa a segunda posição com relação a área cultivada e produção de anonáceas. De acordo com o Censo Agropecuário (2017), a produção brasileira passou de 7,5 milhões de frutos sendo que aproximadamente 90% desse total foi produzido na região Nordeste. O valor da

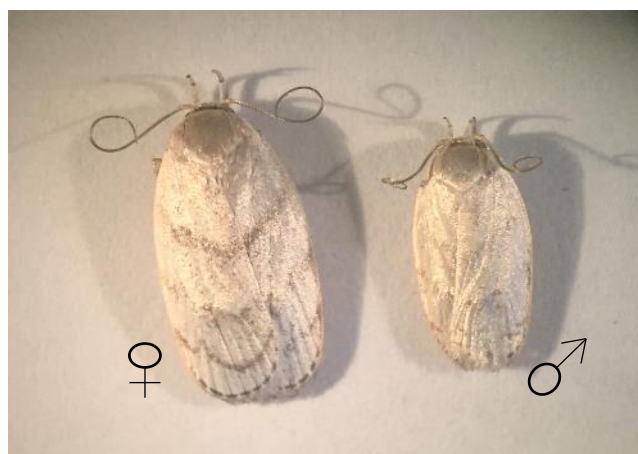
produção nacional no ano de 2017 ultrapassou R\$ 24 milhões com 2.760 hectares de área colhida (IBGE, 2019).

As gravioleiras devem ser mantidas constantemente livres de plantas daninhas, especialmente as gramíneas, que se constituem em fortes concorrentes por água e nutrientes, debilitando o crescimento das plantas desde a fase de mudas até a produção (SÃO JOSÉ, 2003). Vários insetos, ácaros e doenças são relacionados atacando as flores, folhas, ramos e frutos desta anonácea (JUNQUEIRA *et al.*, 1996; JUNQUEIRA *et al.*, 2014). As principais pragas que afetam as anonáceas são: *Cerconota anonella* (broca do fruto), *Bephratelloides pomorum* (broca da semente), *Cratosomus spp* (broca do tronco), *Philonis sp* (broca do ponteiro dos ramos) e cochonilhas (SÃO JOSÉ, 2003; HERNÁNDEZ *et al.*, 2018). Além disso, as principais doenças enfrentadas por esta cultura, de maior importância nas áreas produtoras do Brasil, são causadas por fungos durante o florescimento e a frutificação. Entre elas, temos: Tombamento ou canela-preta (*Rhizoctonia solani*), podridão-de-raízes (*Phytophthora ssp.*, *Cylindrocladium clavatum*), Cancrose (*Phomopsis sp.*), podridão-parda-dos-frutos (*Rhizopus stolonifer*, *Botryodiplodia theobromae*), etc (JUNQUEIRA *et al.*, 1996; JUNQUEIRA *et al.*, 2014).

Um dos principais obstáculos à exploração econômica destas frutíferas é a existência de um complexo de pragas que atacam estas culturas, causando graves prejuízos a produção (BRAGA SOBRINHO, 2010).

## 2.2 *Cerconota anonella*

**Figura 4:** Insetos adultos de *Cerconota anonella*.



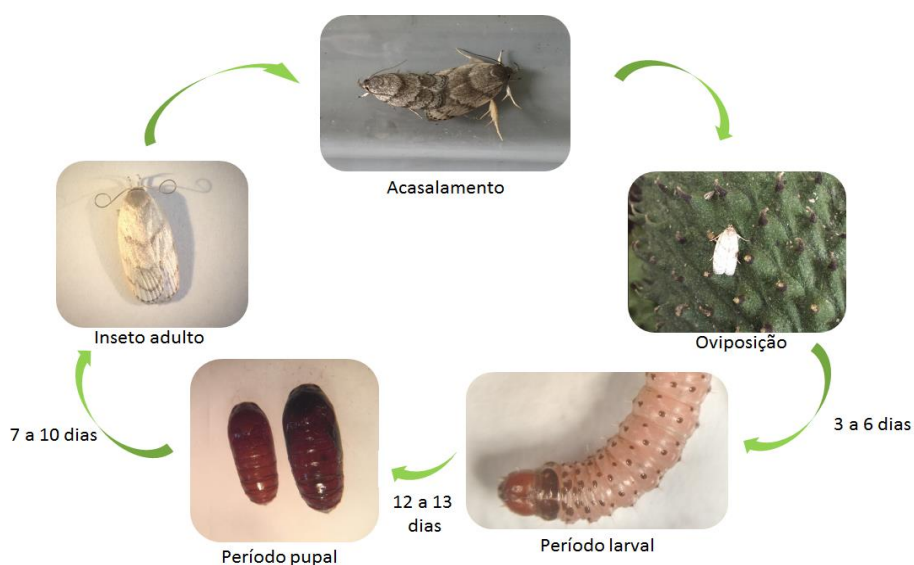
Fonte: Autor, 2019.

Denominada bicho-da-graviola ou broca-do-fruto, *Cerconota anonella* (Sepp, 1830) (**Figura 4**), é considerada uma das pragas de maior importância das anonáceas, devido aos danos expressivos que causam aos frutos, danificando a polpa, reduzindo o seu valor comercial (PIRES *et al.*, 2016). Os prejuízos podem variar de 60% a 100% da produção (PEREIRA *et al.*, 2019). No Brasil, a ocorrência da broca-do-fruto já foi constatada nos estados de São Paulo, Amazonas, Pará, Pernambuco, Bahia, Ceará, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Alagoas e Distrito Federal (BRAGA SOBRINHO, 2010).

São insetos de hábito noturno. Sua coloração irá mudar de acordo com o seu estágio de desenvolvimento, que o lepidóptero se encontra em seu ciclo de vida. Os ovos possuem coloração que varia de esverdeado a amarelado. A larva pode chegar a tingir 2 cm de comprimento e apresentar coloração rosada. A pupa apresenta coloração marrom. Quando adulto apresenta coloração branco-acinzentada, com reflexos prateados, medindo aproximadamente 2,5 cm de envergadura. As asas possuem fundo branco prateado, com três listras irregulares e curvas cinza. (OLIVEIRA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2017).

O ciclo de vida desta praga (**Figura 5**), quando criada em frutos ou em condições de laboratório, tem duração aproximada de 36 dias.

**Figura 5-** Ciclo de vida da *C. anonella*.



Fonte: Autor, 2019.

As fêmeas, depois de acasaladas, depositam seus ovos sobre os frutos, brotações e flores. Esses ovos possuem período embrionário de 3 a 6 dias e cada fêmea pode ovipositar até 310 ovos durante seu ciclo de vida. Após eclodirem, passam para a fase larval, durando em média 12 a 13 dias, nesta fase o inseto passa por cinco instares. Depois as larvas passam para o estágio de pupa. A larva pode empupar no interior do fruto, em sua superfície, na planta ou até mesmo no solo. O período pupal dura em torno de 7 a 10 dias, após o qual emerge a mariposa, completando assim seu ciclo de vida (PEREIRA; BERTI-FILHO, 2009; BITTENCOURT; SOBRINHO; PEREIRA, 2007, SILVA *et al.*, 2017). A faixa ótima de desenvolvimento para vários lepidópteros-praga está entre 15°C (limiar mínimo de temperatura) e 38°C (limiar máximo de temperatura), sendo 25°C a temperatura ideal, na qual o desenvolvimento é mais rápido (BRITO, 2010).

### **2.3 Métodos de controle**

Para controlar a ação de *C.anonella*, sobre as espécies de *Annona*, três métodos de controle podem ser empregados: controle cultural, controle químico e controle biológico.

No controle cultural, uma técnica utilizada é o ensacamento dos frutos com diferentes invólucros, pois é eficaz como prática fitossanitária, porém demandando gastos com mão de obra. Os frutos infectados da planta e do solo devem ser eliminados, por enterro ou queima (BRITO, 2010).

Silva e Broglio (2019) desenvolveram um estudo utilizando como invólucros, saco de plástico, de papel kraft e de TNT.

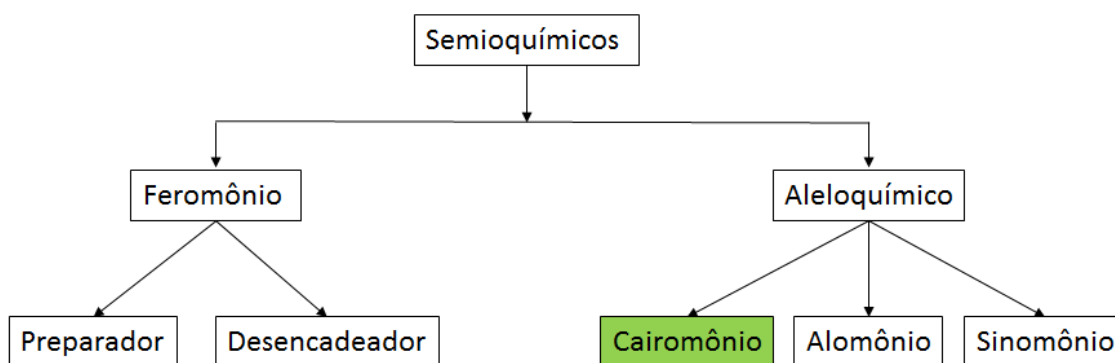
O controle químico pode ser feito usando produtos organo-sintéticos utilizados em outras culturas e para outras pragas. O controle visa combater a lagarta na sua fase inicial, visto que o controle químico não é eficaz quando a larva da *C. anonella* já se encontra instalada no fruto. Podem ser usados inseticidas a base de triclorfon ou fention, caracterizados como produtos com boa ação de profundidade (MELO, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2004). Sua principal desvantagem refere-se ao seu alto custo e os efeitos prejudiciais ao homem e ao meio ambiente. Faz-se necessário a utilização de alternativas que minimizem os efeitos adversos (SILVA; BATISTA, 2016).

O controle biológico assume grande importância no combate a pragas de culturas, sendo uma das medidas utilizadas para manter as pragas com baixo nível populacional sem o uso de agrotóxicos (HOLTZ, 2001). Foi registrada a ocorrência em Maceió (Alagoas), em condições de campo, o parasitismo de *Apanteles sp.*, *Rhysipolis sp.* (Hymenoptera: Braconidae) e *Xiphosomella sp.* (Hymenoptera: Ichneumonidae) sobre lagartas de *C. anonella* (BRITO, 2010).

#### 2.4 A Comunicação química mediada por semioquímicos

Os insetos utilizam os odores para fazer a seleção de plantas hospedeiras, escolha dos locais para oviposição, corte e acasalamento. Durante o comportamento de busca e seleção de hospedeiros os insetos utilizam sinais de diferente natureza, entre eles vários semioquímicos produzidos pelas plantas hospedeiras (HORAS, 2009). Os semioquímicos são sinais químicos envolvidos na comunicação entre espécies. Estão divididos em feromônios e aleloquímicos sendo classificados de acordo com o tipo de comportamento que provocam no organismo receptor (**Figura 6**) (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009).

**Figura 6-** Representação esquemática dos semioquímicos e suas principais subclasses.



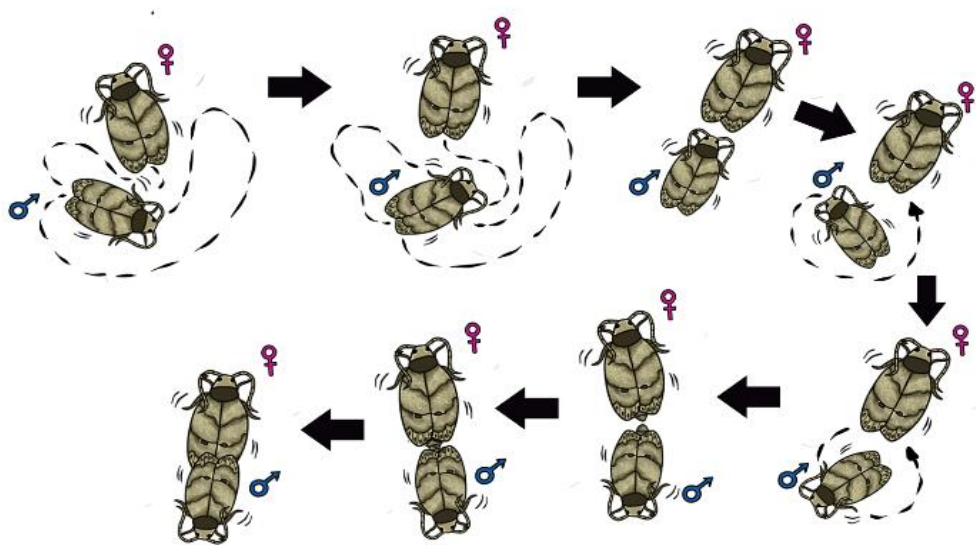
Fonte: Adaptado de PEREIRA (2007).

Os feromônios envolvem indivíduos da mesma espécie e são de grande importância para espécies que dependem da comunicação química para o comportamento reprodutivo. Os compostos voláteis provenientes de plantas,

por sua vez, atraem os inimigos naturais como os insetos herbívoros (CORRÊA; SANT'ANA, 2001).

Os feromônios dos insetos são um dos alvos de pesquisa em semioquímicos devido ao potencial de aplicação prática na agricultura (SUBHASH; SHASHANK, 2019). Os comportamentos mais comuns mediados por feromônio são a atração para acasalamento, a agregação de indivíduos de ambos os sexos, a demarcação de espaço ou formação de trilhas (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009). Assim como em outras espécies de lepidópteros, fêmeas e machos de *C. anonella* utilizando o feromônio (sexual) para mediar sua comunicação para o acasalamento. As fêmeas são as responsáveis pela liberação desses sinais, que são perceptíveis pelos machos através das sensilas presentes em suas antenas desencadeando uma sequência de comportamentos que inclui caminhar, toque da antena no abdômen, movimento alternado do abdômen e elevação, giro do corpo e cópula (**Figura 7**).

**Figura 7-** Esquema do comportamento reprodutivo de *C. anonella*.



Fonte: Adaptado de DA SILVA *et al.* (2006).

Os aleloquímicos dependendo da vantagem que conferem ao organismo emissor e/ou receptor, podem atuar como alomônios, cairomônios ou sinomônios. Os alomônios são substâncias que favorecem o emissor. As operárias de algumas espécies de formigas, por exemplo, produzem um jato de substâncias repelente a animais intrusos. Os cairomônios são substâncias que

favorecem exclusivamente ao receptor, como é o caso do himenóptero parasitóide de lagartas *Cardiochiles nigriceps* que responde aos hidrocarbonetos produzidos pelas glândulas mandibulares da lagarta *Heliothis virescens*. Os sinomônios são substâncias que favorecem tanto ao emissor quanto ao receptor. Um exemplo típico deste tipo de aleloquímico são as substâncias voláteis emitidos pelo milho, *Zea mays*, quando atacado por lagartas de *Spodoptera exigua*, que atraem as fêmeas do parasitóide *Cotesia marginiventris*, um inimigo natural destas lagartas (VILELA, 2001; PEREIRA, 2007, ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009).

Os cairomônios têm sido investigados como alternativa para o manejo comportamental de pragas, pois estas substâncias químicas além de indicar a presença do alimento, induzem, entre outras ações, a alimentação e a oviposição (STRAPASSON, 2012).

A qualidade de recepção destes sinais dependerá da quantidade e da volatilidade das substâncias liberadas a partir da fonte, da velocidade do vento e da interferência da vegetação entre outras barreiras físicas (MARCHADO *et al.*, 2009).

## **2.5 Interação planta-hospedeiro e Biossensores naturais**

Atualmente, a comunidade química entre os insetos esta sendo cada vez mais explorada para o manejo integrado de pragas. Nessa comunicação química, os compostos orgânicos voláteis (COV'S) emitidos pelas plantas desempenham um papel fundamental (SUBHASH; SHASHANK, 2019).

As plantas emitem compostos orgânicos Voláteis (COV's) que podem revelar o status fisiológico ou uma situação de estresse ao qual a planta está sujeita (RIFFEL *et al.*, 2010).

As substâncias voláteis emitidas por plantas podem influenciar em quase todos os aspectos da vida dos insetos, tais como: alimentação, comportamento sexual, agregação, oviposição (HORAS, 2009). Deste modo, os insetos são capazes de diferenciar hospedeiros inadequados ao detectar misturas de voláteis normalmente não encontradas nos seus hospedeiros.

Estes compostos são percebidos por neurônios quimio receptores especializados presentes nas antenas, chamadas sensilas, envolvidas na detecção de estímulos químicos, mecânicos e térmicos (YUVARAJ, 2018).

O sistema receptor olfativo nos insetos permite perceber alguns destes voláteis das plantas que, eles compilam um odor que atua como uma mensagem química. Uma vez que existe uma diversidade de odores no ambiente, este mecanismo é altamente específico a substâncias bioativas (HORAS, 2009; FERREIA *et al.*, 2001).

## **2.6 Microscopia eletrônica de varredura**

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é uma ferramenta de grande importância aos estudos entomológicos para caracterização da morfologia dos insetos. Possui alta resolução e grande profundidade de foco, o que permite o levantamento e ilustração de um grande número de caracteres (DE AZEVEDO FILHO, 2008).

O MEV utiliza elétrons que são emitidos na superfície da amostra. Seu canhão eletrônico gera um fino feixe de elétrons que atua como uma sonda, a qual passa rapidamente sobre a amostra, num rastreamento que pode ser controlado em fração de segundo a vários segundos. As variações topográficas da superfície da amostra afetam o padrão da emissão, resultando em uma imagem tridimensional. Sua grande vantagem é a elevada profundidade de campo, da ordem de 10  $\mu\text{m}$  para aumentos de cerca de 10.000 vezes, chegando a 1 cm para aumentos de 20 vezes (DE CASTRO, 2002).

Para assegurar uma ótima preservação da ultraestrutura a ser obtida, é recomendado para a maioria dos tecidos animais e vegetais a utilização do glutaraldeído como fixador para a microscopia eletrônica, devido às suas propriedades de penetração e precipitação das substâncias proteicas da célula (DE CASTRO, 2002).

## **2.7 Análise molecular**

A determinação das espécies de lepidópteros baseia-se na análise dos caracteres morfológicos. Entretanto, a análise molecular pode ser utilizada na identificação do perfil genético dos insetos, caracterização e sua identificação.



Em 2003, Paul Herbert e colaboradores utilizaram na identificação de espécies animais, o código de barras genético (*Barcode*), para a autenticação das identificações. No DNA as sequências do gene funcionam como um código genômico com quatro nucleotídeos (adenina, timina, citosina e guanina).

O sistema de identificação, possibilita a identificação de amostras desconhecidas através de sequências de DNA de uma região padrão (ex: *CO1* em animais) que são analisadas com base no banco de dados do NCBI (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007). O NCBI é uma plataforma virtual que tem como objetivo a aquisição, armazenamento, análise e publicação de registros de *DNA* que permite associar outros tipos de dados às amostras, como dados taxonômicos, ponto e data de coleta, entre outras informações e sempre que possível realiza a identificação em nível específico.

Em um estudo utilizando dados morfológicos, ecológicos e de DNA Herbert *et al.*, (2004) demonstraram, a eficiência da região *CO1* em discriminar 10 espécies crípticas de *Astrartes fulgerator* (Lepidoptera: Hesperiiidae), anteriormente reconhecida como uma única espécie.

A técnica de extração e identificação do DNA está baseada num sistema de identificação de diferentes taxas, que codifica parte de uma enzima terminal da cadeia respiratória da mitocôndria, permitindo a distinção de diferentes espécies com alta sensibilidade, especificidade e confiabilidade nos resultados (DE BRITO *et al.*, 2015; GALIMBERTI *et al.*, 2013). Sua vantagem está no grande número de exemplares que podem ser estudados, pois possui características como herança materna, baixo polimorfismo ancestral, universalmente presente entre os animais, alto número de cópias por células, além de apresentar taxa de mutação diferenciada entre as espécies (AZEREDO, 2005).

Técnicas baseadas na identificação do DNA são difundidas e ganham destaque devido à necessidade de pequenas quantidades amostrais. Estudos de filogenia molecular são importantes na elucidação do processo evolutivo em todos os níveis de classificação dos organismos.

O alinhamento das sequências de DNA é utilizado para identificar as posições dos nucleotídeos que ocupam a mesma posição, pois eles supostamente têm um ancestral comum, porém não são necessariamente iguais (SILVA, 2008).

## 2.8 Extração e identificação de compostos voláteis

### 2.8.1 Técnica de extração-Aeração

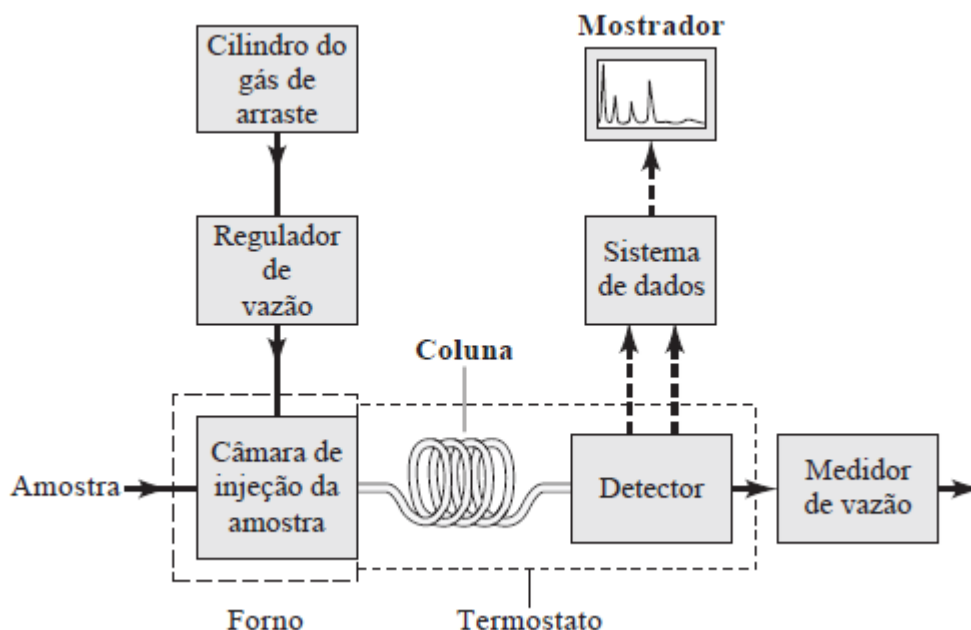
Um método popularmente usado para a coleta de voláteis é o headspace, que pode ser classificado como dinâmico ou estático, o que diferencial as duas técnicas é a passagem de ar dentro sistema (JOBICHEN; SELVANARAYANAN, 2019).

O *Headspace* dinâmico é um método de aeração para coleta de voláteis de amostras complexas. Ele envolve um fluxo de ar que purga as substâncias voláteis, emitidas pela amostra, a uma matriz adsorvente. Antes de fluir através da amostra, o ar de purga passa por um filtro de carvão ativo para retirar impurezas. Deve ser sempre montado usando materiais que não liberem voláteis, pois podem causar a contaminação da amostra. Obtida a amostra, deve ser feita sua dessorção, processo que consiste na extração das substâncias coletadas pela passagem de um solvente na superfície do adsorvente (FERREIRA *et al.*, 2001; JOBICHEN; SELVANARAYANAN, 2019).

### 2.8.2 As Técnicas de identificação de compostos voláteis

Cromatografia é um método físico-químico de separação. Nela, os componentes de uma amostra vaporizada são separados 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 (CG), a amostra é vaporizada e injetada na cabeça da coluna cromatográfica. A eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte (**Figura 8**). 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).

**Figura 8-** Diagrama de blocos de um típico cromatógrafo a gás.

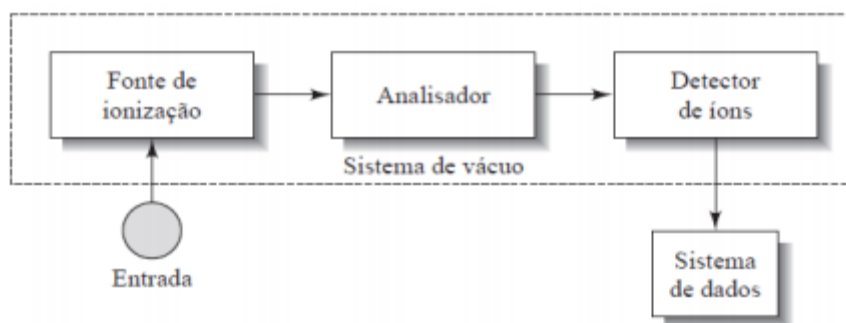


Fonte: (SKOOG, 2006).

Para o isolamento e identificação de semioquímicos normalmente é empregado a técnica da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas 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) (CHIARADIA *et al.*, 2006).

No espectrômetro de massas (**Figura 9**), 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 sua razão 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,2006).

**Figura 9-** Diagrama de blocos de um espectrômetro de massas.

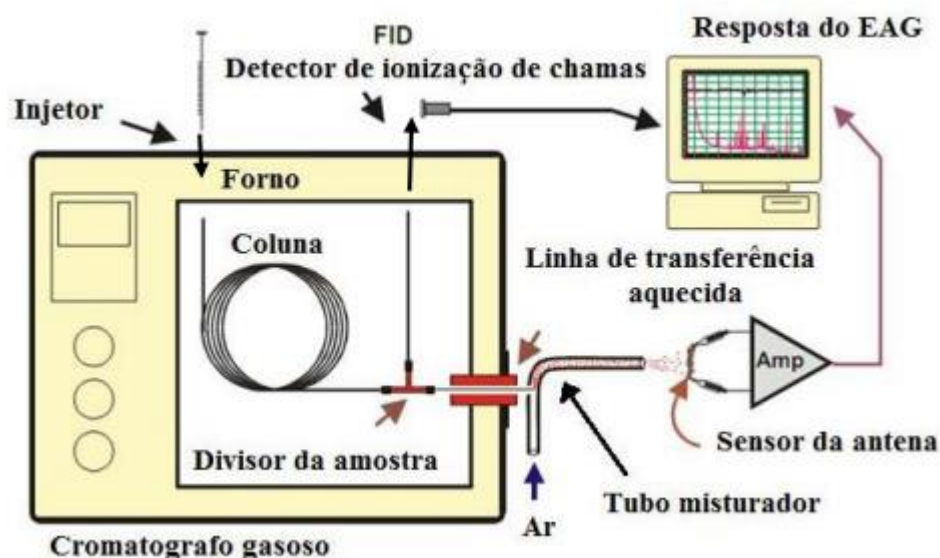


Fonte: (SKOOG, 2006).

A técnica da cromatografia gasosa acoplada ao detector eletroantenográfico (CG-EAG) foi primeiramente relatada por Moorhouse *et al.* (1969). O EAG (tendo características como alta sensibilidade e especificidade) quando acoplado ao cromatógrafo gasoso (que possui alta resolução na separação de misturas), permite a análise de misturas complexas obtidas de insetos e plantas (MORAES *et al.*, 2008).

No CG-EAG (**Figura 10**) há uma divisão do fluxo de gás que faz a eluição dos compostos direcionando-se ao 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 e registrada em um gráfico denominado eletroantenograma,

**Figura 10-** Esquema de um CG-EAG.



Fonte: Adaptado de Synthec (2004).

A eletroantenografia (EAG) é uma técnica de bioensaio que estabelece o potencial dos voláteis da planta na estimulação olfativa de um inseto, serve para registrar a mudança no potencial de olfato entre a ponta de uma antena e sua base em resposta à estimulação por um odor de planta (MADHU; DODDABASAPPA, 2019). A antena do inseto é fixada entre dois eletrodos e quando recebe um estímulo químico ao qual tenha sensibilidade há uma variação no potencial elétrico que é registrado e aparece no computador na forma de um eletroantenograma (MORAES *et al.*, 2008).

## **2.9 Bioensaios comportamentais e eletrofisiológico**

Para obter uma resposta comportamental de um determinado organismo frente a uma fonte de estímulo químico, é necessário observar as interações existentes entre esses fatores (SILVA, 2004).

Com a utilização dos bioensaios comportamentais é possível medir a resposta motora do inseto tanto do ponto de vista quantitativo como qualitativo. A resposta é qualificada a partir das atividades comportamentais relacionadas a essa percepção e quantificada pelo número de insetos que respondem a determinado estímulo (STEIN; SANT'ANA, 2001).

Analisando a resposta exibida por determinado inseto, observa-se normalmente a antenação, elevação do pronoto, vibração das asas e caminhada do inseto em direção à fonte. O inseto pode exibir um comportamento de busca, dependendo da bioatividade do estímulo (STEIN; SANT'ANA, 2001).

Duas técnicas frequentemente utilizadas em bioensaios laboratoriais são a olfatometria e túnel-de-vento. O mecanismo de funcionamento para ambas as técnicas é muito semelhante, é fundamental que haja um organismo teste, uma fonte de estímulo, uma arena para liberação deste organismo e um fluxo de ar com velocidade controlada (FERREIRA *et al.*, 2001).

O uso do túnel-de-vento é mais apropriado para insetos que se locomovem principalmente voando como lepidópteros e dípteros, uma vez que o seu espaço físico é grande. As fontes odoríferas são testadas isoladamente, não dando opção de escolha para o organismo teste. Já o olfatômetro é mais apropriado para insetos que se locomovem no chão como coleópteros e

heterópteros, podendo ser usado também para insetos voadores pequenos. A arena pode ser bifurcada ou múltipla, dando assim opção de escolha para o organismo teste (FERREIRA *et al.*, 2001).

Os testes de túnel de vento têm sido amplamente utilizados na pesquisa de feromônios de insetos para estudar os voláteis de plantas, como cairomônios e sinomônios (SUBHASH; SHASHANK, 2019).

## 2.10 REFERÊNCIAS

ANAYA ESPARZA, L. M.; MONTALVO-GONZÁLEZ, E. Compostos bioativos da fruta de graviola (*Annona muricata* L.). **Bioactive Compounds in Underutilized Fruits and Nuts**, p. 175-189, 2020.

ARÔXA, C. N. F. *et al.* Prospecção Tecnológica sobre o Potencial Industrial do Resíduo da Graviola (*Annona muricata* L.). **Revista INGI-Indicação Geográfica e Inovação**, v. 4, n. 1, p. 664-673, 2020.

AZEREDO, A. M. L. O código de barras da vida baseado no DNA “Barcoding of Life”: Considerações e perspectivas. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. SP, CBMEG UNICAMP**, 2005.

BITTENCOURT, M. A.; SOBRINHO, C. M.; PEREIRA, M. J BRAGA SOBRINHO, R. **Potencial de exploração das anonáceas no nordeste do Brasil**. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, 2010.

BRAGA SOBRINHO, R. Produção integrada de Anonáceas no Brasil. **Embrapa Agroindústria Tropical-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2014.

BRITO, E. A. **Flutuação populacional e avaliação de táticas de controle sobre a broca-do-fruto das anonáceas *Cerconota anonella* (Lepidoptera: oecophoridae)**. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte cromatografia associada à espectrometria de massa acoplada á espectrometria de massa na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, Vol. 31, No. 3, 623-636, 2008.

CORRÊA, A. G.; SANT'ANA, J. Fundamentos da comunicação química de insetos. In: FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. (Ed.). **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos: EdUFSCAR, 2001. p. 9-21. (Textos da Escola de Verão em Química, v. 3).

DA SILVA, *et al.* Estudo fitossociológico da comunidade infestante no pomar de pinha (*Annona squamosa* L.) no Município de Rio Largo–Alagoas. **Revista Craibeiras de Agroecologia**, v. 5, n. 1, p. 9435, 2020.

DE AZEVEDO FILHO, W. S. *et al.* Técnicas de preparação de amostras para estudos de insetos com microscópio eletrônico de varredura. **Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)**, 2008.

DE BRITO, M. A. I. *et al.* DNA barcoding reveals high substitution rate and mislabeling in croaker fillets (Sciaenidae) marketed in Brazil: The case of “pescada branca” (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus*). **Food Research International**, v. 70, p. 40-46, 2015.

DE CASTRO, L. A. S. Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura. **Embrapa Clima Temperado-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**, 2002.

FERREIRA, J. T. B; CORRÊA, A. G; VIEIRA, P. C. **Produtos naturais no controle de insetos** – (Série de textos da escola de verão, Vol. III). 176p. Ed. UFSCar, 2001.

GALIMBERTI, A. *et al.* DNA barcoding as a new tool for food traceability. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 55-63, 2013.

HORAS, V. R. **“*Crociosema aporema* (Walsingham, 1914) (Lepidoptera: Tortricidae): Resposta olfativa aos voláteis da soja e comportamento de acasalamento.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

**IBGE** - Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias/ Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 2017. < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6616#resultado>>. Acesso em: jan. de 2019.

JOBICHEN, C.; SELVANARAYANAN, V. Role of Plant Volatiles, Pest-Resistant Varieties and Transgenics in Tri-trophic Interactions. In: **Experimental Techniques in Host-Plant Resistance**. Springer, Singapore, 2019. p. 245-252.

JUNQUEIRA, N. T. V. *et al.* **Graviola para exportação: aspectos fitossanitários.** EMBRAPA-SP, 1996).

JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P. Principais doenças de anonáceas no Brasil: descrição e controle. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. SPE1, p. 55-64, 2014.

MELO, B. S. C. **Avaliação do potencial inseticida de produtos naturais e sintéticos o brocas da graviola.** Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

MADHU, T. N.; DODDABASAPPA, B. Electroantennogram for Recording Olfactory Responses of an Insect to Plant Volatiles. In: **Experimental Techniques in Host-Plant Resistance**. Springer, Singapore, 2019. p. 53-56.

- MARCHADO, R. C. M. **Interações inseto – planta e suas implicações no manejo integrado de pragas**. Monografia (Pós-graduação *LATO SENSU*) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul. 2009.
- MORAES, M.C.B. *et al.* Eletroantenografia: a antena do inseto como um biossensor. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos**, 2008.
- MOGHADAMTOUSI, S. Z. *et al.* *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 7, p. 15625-15658, 2015.
- MOORHOUSE, J. E. *et al.* methods for use in studies of insect chemical communication. **Nature**, London, v. 223, p. 1174-1175, 1969.
- OLIVEIRA, L. P. S. *et al.* ***Cerconota Anonella* (Sepp., 1830) (Lepidoptera: Oecophoridae), A Principal praga da gravioleira**. Revista científica eletrônica da Agronomia. Nº. 05, 2004.
- OLIVEIRA, A. S. *et al.* Efficacy of insecticides in fruit borer control and residues on sugar apple fruit. **Revista Ceres**, v. 64, n. 2, p. 132-137, 2017.
- PEREIRA, L. G. B. **Feromônios: Uma Alternativa no controle de insetos-praga**. Dossiê técnico. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais / CETEC. Agosto, 2007.
- PEREIRA, M. J. B.; BERTI-FILHO, E. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações da broca-do-fruto *Annona* (*Cerconota anonella*). **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, nov., 2009, p. 2278-2284.
- PEREIRA, M. C. T. *et al.* Anonáceas: pinha, atemoia e graviola. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v. 32, n. 264, p. 26-34, 2011.
- PEREIRA, M.C.T. *et al.* **101 culturas: manual de tecnologias agrícolas**. 2. ed. rev. atual. Belo Horizonte: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 2019.
- HEBERT, P. D. N. *et al.* Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 41, p. 14812-14817, 2004.
- HEBERT, P.D.N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.
- HERNÁNDEZ-FUENTES, Luis Martín *et al.* Xylophagous Insects Associated with Sourp (*Annona muricata* L.) 1 Branches, Affected by *Lasiodiplodia theobromae* Pat2. **Southwestern Entomologist**, v. 43, n. 2, p. 543-546, 2018.



RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P.D.N. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). **Molecular ecology notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.

RIFFEL, A. *et al.* **O Dialeto das plantas**. 01 de novembro de 2010. Disponível em <<http://zoomnews.com.br>>. Acessado em 23 de Fevereiro de 2019.

SÃO JOSÉ, ABEL REBOUÇAS *et al.* Atualidades e perspectivas das Anonáceas no mundo. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal-SP**, v. 36, p. 86-93, 2014.

SILVA, E. L. **Estudo das interações intra- e interespecíficas das pragas das anonáceas, *Bephratelloides pomorum* Fab. (Hymenoptera: Eurytomidae) e *Cerconota Anonella* Sepp. (Lepidoptera: Oecophoridae) e da cana-de-açúcar, *Diatreasaccaralis* Fab. (Lepidoptera: Cambridae) com seus Hospedeiros**. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia- Ecologia química) – Departamento de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas. 2004.

SILVA, U. B. Reconstrução Filogenética de microorganismos a partir da Via de Reparo por Excisão de Nucleotídeo. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade de Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

SILVA, L. S. *et al.* MANEJO DE *Cerconota anonella* E *Bephratelloides pomorum*: UM DESAFIO PARA OS ANONICULTORES. **REVISTA MIRANTE**, Anápolis (GO), v. 10, n. 5, dez. 2017. ISSN 19814089

SILVA, A. B.; BATISTA, J. L. **Controle de insetos-praga: qual método é mais apropriado?** Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/controle-de-insetos-praga-qual-metodo-e-mais-apropriado>>. Acesso em 05 de set. 2019.

STEIN, K.; SANT'ANA, J. Extração e identificação de substâncias bioativas de insetos. In: FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. (Ed.). **Produtos 70 naturais no controle de insetos**. São Carlos: EdUFSCAR, 2001. p. 47-74. (Textos da escola de verão em química, v. 3).

STRAPASSON, P. **Percepção química de *Grapholita molesta* (BUSCK) (Lepidoptera: TORTRICIDAE) a substâncias alimentares e voláteis de maçã: resposta quimiotáxica, eletrofisiológica e monitoramento em pomres de macieira com confusão sexual**. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SUBHASH, S.; SHASHANK, P. R. Wind Tunnel: A Tool to Test the Flight Response of Insects to Semiochemicals. In: **Experimental Techniques in Host-Plant Resistance**. Springer, Singapore, p. 65-69, 2019.

TEIXEIRA, P. C. M. AVALIAÇÃO DE MODELOS EMPÍRICOS DE CINÉTICA DE SECAGEM DA AMÊNDOA DA FRUTA DO CONDE (*Annona squamosa* L.). **Revista Cereus**, v. 12, n. 2, p. 233-240, 2020.

VILELA, E. F. & DELLA LUCIA, T. M. C. Introdução a semioquímicos e terminologia.- **Feromônio de insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas**. Edição Nº2. Ed. Holos, p 9-10, 2001.

YUVARAJ, J. K. *et al.* Diversity of olfactory structures: A comparative study of antennal sensilla in Trichoptera and Lepidoptera. **Micron**, v. 111, p. 9-18, 2018.

ZARBIN, P. H. G; RODRIGUES, M. A. C. M; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Quím. Nova**, v.32 nº3, São Paulo, 2009.

### 3. OBJETIVOS

#### Geral

O presente estudo objetiva fazer um estudo sobre as patentes de semioquímicos de *Annona* utilizadas no controle de pragas, fazer o estudo da biologia molecular, identificar as sensilas presentes nas antenas deste inseto, extrair e identificar os compostos voláteis de plantas de *A. muricata* e *A. squamosa* em diferentes estágios de maturação de plantas (vegetativo, florado e frutificado) e verificar a ação do sinergismo para a broca *C. anonella*.

#### Específicos

- i) Estabelecer e manter população de *C. anonella* oriundas de frutos infestados, coletados em Alagoas e obter plantas de *A. squamosa* e *A. muricata* para extrair os constituintes voláteis nos estágios vegetativo, florado e frutificado, pelo emprego das técnicas de aeração e extração por solvente;
- ii) Estudar a estrutura morfológica e superficial das antenas do inseto utilizando a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e fazer a extração do DNA do inseto;
- iii) Efetuar bioensaios comportamentais, a fim de qualificar e quantificar a resposta motora de *C. anonella* frente aos extratos das plantas hospedeiras, obtidos no processo de aeração;
- iv) Identificar os COV'S presentes nos extratos de *A. squamosa* e *A. muricata*, em diferentes estágios de desenvolvimento, por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM);
- v) Identificar os COV'S bioativos presentes nos extratos de *A. squamosa* e *A. muricata*, em diferentes estágios de desenvolvimento, por Cromatografia Gasosa acoplada à Eletroantenografia (CG-EAD);
- vi) Desenvolver formulações contendo os compostos individuais que eliciaram resposta nas antenas de fêmeas e suas respectivas misturas, em diferentes combinações, para emprego em ensaios comportamentais que serão conduzidos em laboratório.
- vii) Verificar a existência de sinergismo entre o feromônio sexual liberado por fêmeas virgens de *C. anonella* e os compostos voláteis liberados pela planta hospedeira.

**4. Capítulo I – O USO DE SEMIOQUÍMICOS DE ESPÉCIES DE *Annona*  
COMO ATRAENTE NO MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS: UM ESTUDO  
PROSPECTIVO**

## O USO DE SEMIOQUÍMICOS DE ESPÉCIES DE *Annona* COMO ATRAENTE NO MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS: UM ESTUDO PROSPECTIVO

### RESUMO

Considerando a importância de frutos de *Annona* em nível de agroprodução nacional e internacional, o presente estudo teve como objetivo realizar uma prospecção tecnológica acerca da utilização de métodos de controle de pragas desta cultura, especificamente a *Cerconota anonella*, investigando o uso de semioquímicos de espécies do gênero *Annona*. A busca de anterioridade foi conduzida através da consulta de patentes e artigos de periódicos científicos nas bases PATENTINSPIRATION, WIPO, INTI, Science Direct e Scopus, respectivamente. Foram recuperadas 201 patentes na base PATENTINSPIRATION quando utilizado o termo “*Annona*”. Dessas, foram depositadas 32 (15,92%) na China, 21 (10,44%) nas Filipinas, 19 (9,45%) na Índia e 5 (2,48%) no Brasil, que ocupa o nono lugar no ranking com apenas 5 depósitos de patentes. Nenhuma das patentes se refere a cairomônios de espécies do gênero *Annona* para *C. anonella*, indicando a originalidade do tema proposto em se tratando de patentes depositadas no Brasil.

**Palavras-chave:** Cairomônio; Pesquisa; Controle.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

A pinheira (*Annona squamosa*) e a gravioleira (*Annona muricata*) têm destaque na fruticultura em várias partes do mundo e grande aceitação comercial. No Brasil, as áreas comercialmente cultivadas estão concentradas nos Estados do Nordeste, destacando-se Alagoas e Bahia como principais produtores (BRAGA SOBRINHO, 2014; OLIVEIRA, 2017). Sua produção se constitui como um importante fator de impacto econômico, crescente demanda e interesse pela polpa, por parte do consumidor e das indústrias que utilizam o fruto como matéria-prima para produção de sucos, doces, produtos medicinais, cosméticos e outros (ARAÚJO, LEONEL; NETO, 2008; DE MORAES *et al.*, 2018).

Um dos principais obstáculos à exploração econômica destas frutíferas é a existência de um complexo de pragas que atacam estas culturas, causando graves prejuízos que comprometem a sua produção (BRAGA SOBRINHO, 2014). Dentre elas, uma das principais é o lepidóptero *Cerconota anonella*, (Sepp.,1830) (Lepidoptera: Depressariidae), popularmente conhecido como broca do fruto, a qual possui hábito noturno e é classificada como sendo uma praga primária por limitar diretamente o cultivo de plantas de *A. Squamosa* (pinha, fruto-do conde) Os danos expressivos causados por *C. anonella* são expressados nos frutos, cuja polpa é danificada, ocorrendo uma redução de seu valor comercial e a produção desta cultura (MICHELETTI *et al.*, 2001; MARTELLETO; IDE, 2008 ). Segundo Oliveira *et al.*, (2001) o potencial de dano sobre as plantas de *A. Muricata* (graviola), na ausência de frutos, concentra-se nas flores e botões florais deixando-os secos e com manchas escuras de forma irregular; impedindo assim a reprodução dos frutos, e conseqüentemente contribuindo para a diminuição de frutos disponíveis para o comércio.

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) que plantas emitem, tais como àquelas pertencentes ao gênero *Annona*, alvo do presente estudo, podem revelar o status fisiológico ou uma situação de estresse ao qual a mesma está sujeita e podem influenciar em quase todos os aspectos da vida de insetos que sequestram ou adquirem compostos de plantas hospedeiras e os usam como precursores de seu feromônio sexual (RIFFEL *et al.*, 2010; HORAS, 2009; BACHMANN, 2015). O perfil dos COVs liberados pode mudar de acordo com a

variedade e estágio fenológico da planta, podendo ser: vegetativo, florado ou frutificado (HARE, 2011; ZHU; PARK, 2005).

Por outro lado, em insetos, a escolha do parceiro sexual é imprescindível para a cópula, através da percepção do macho aos COVs liberados pela fêmea, que desencadeiam uma série de comportamentos, expressada em uma sequência padrão. A escolha do hospedeiro por parte da fêmea acasalada, no momento da postura, é fundamental para a sobrevivência e sucesso da sua prole (NAVA, 2005; LOPES *et al.*, 2009). Assim, o entendimento dos mecanismos que atuam nas interações entre fêmeas e planta hospedeira é de grande importância para a preservação do cultivar.

Por este motivo, as interações bitróficas (inseto-planta e inseto-inseto) vêm sendo pesquisadas, sendo os COVs cairomonais investigados como alternativa para o manejo comportamental de pragas, pois estas substâncias químicas utilizadas na comunicação entre espécies diferentes, além de indicar a presença do alimento, induzem, entre outras ações, a alimentação e a oviposição (STRAPASSON, 2012; BLADE, 2017). Na interação inseto-inseto, os feromônios sexuais desempenham papel fundamental no comportamento de atração e acasalamento de insetos; muitas espécies de besouros se alimentam e acasalam em plantas hospedeiras como resultado da atratividade pelo feromônio sexual (ZHANG *et al.*, 2012)

Algumas medidas de controle, envolvendo tratamentos físicos e químicos, têm sido empregadas na tentativa de minimizar os danos causados por esta praga nos plantios. Com o propósito de substituir o uso de agrotóxicos, novas estratégias ecologicamente corretas e viáveis para a preservação das plantas começam a ser desenvolvidas e aplicadas (SOBHY *et al.*, 2014). A utilização de semioquímicos como os cairomônios em estudos comportamentais é uma estratégia promissora que vem sendo investigada no controle de pragas e, o desenvolvimento de tecnologias inovadoras devem ser estimuladas e portanto, corroboraram no principal objetivo deste estudo: estimar o potencial da geração de um bioproduto baseado em COVs emitidos por plantas de *Anonna* na atração e controle da praga *C. Anonella*.

## 4.2 METODOLOGIA

A busca de anterioridade patentária foi realizada através da consulta às bases de dados de patentes Patentinspiration, WIPO (*World Intellectual Property Organization*), INPI (Instituto Nacional de Propriedade Intelectual), no período de janeiro 2020 a março de 2020 para delineamento do atual cenário tecnológico acerca do uso dos COVs cairomonais de espécies do gênero *Annona* para controle de pragas, utilizando o *string* de busca apresentado na **Tabela 1**.

**Tabela 1-** Palavras chaves utilizadas na busca de patentes e artigos.

Annona	Biocides
Annona and muricata	Cerconota
Annona and squamosa	Pheromone
Annona and lepidoptera	kairomones
Annona and Cerconota	Lepidoptera
Annona and semiochemicals	Control and pest
Annona and compounds	Control and pest and pheromone
Annona and pesticide	Control and pest or pheromone and kairomones
Annona and chromatography	Control and pest and pheromone and kairomones
Annona and volatiles	Control and pest and pheromone and kairomones and lepidoptero

Durante o mesmo período foi realizada a revisão bibliográfica através de buscas de artigos científicos relacionados ao tema, utilizando as bases internacionais Science Direct e Scopus, para comparação com os resultados da revisão patentária. Os campos utilizados para a busca de artigos foram: “título” e “resumo” e os Strings de busca consideraram os operadores booleanos “and” e “or” para indicar aos sistemas de busca como a combinação de descritores deveria ser realizada. Foram utilizados como critérios de inclusão os idiomas português e inglês, o período de busca foi abrangido de 1999 a 2019.

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos para as buscas de anterioridade de patentes e artigos científicos utilizando os strings da **Tabela 1**, são apresentados na **Tabela 2** Como resultados, foram encontrados 201 patentes relacionadas a



palavra-chave *Annona* em caráter mundial desde 1999 a 2019, tendo em vista que foi escolhido documentos depositados em até 20 anos.

**Tabela 2-** Resultados das buscas nas bases PatentInspiration, INPI, WIPO, Scopus e Scienci Direct.

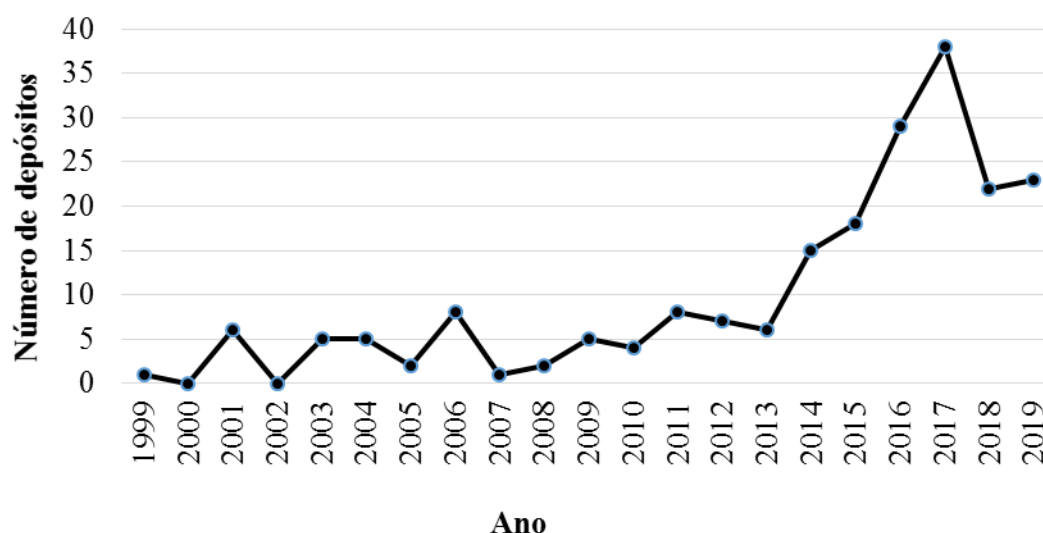
String de busca	Patentinspiration	INPI	WIPO	Scopus	Science Direct
Annona	201	5	193	2795	1856
Annona and muricata	52	4	71	1151	504
Annona and squamosa	96	1	135	1271	598
Annona and lepidoptera	1	0	1	125	58
Annona and Cerconota	0	0	0	18	0
Annona and semiochemicals	0	0	0	4	4
Annona and compounds	24	0	8	1212	1188
Annona and pesticide	2	0	3	228	208
Annona and chromatography	6	0	11	485	439
Annona and volatiles	0	0	0	167	250
Biocides	14	22	4889	13	11750
Cerconota	1	1	1	18	0
Pheromone	3669	51	2524	23489	15580
kairomones	39	1	40	844	682
Lepidoptera	1519	25	1677	38153	10612
Control and Pest	32730	89	16894	58876	54230
Control and pest and kairomones or Cerconota	4	0	16894	104	0
Control and pest or pheromone and kairomones	11	0	1	160	189
Control and pest and pheromone and kairomones	3	0	0	60	189
Control and pest and and kairomones and lepidoptera	0	0	0	20	0

Fonte: Autor, 2020.

Ao analisar os dados fornecidos pelas patentes disponibilizadas percebe-se que o depósito de patentes relacionadas as espécies de *Annona* começou a ter um aumento a partir do ano de 2014. O ápice das publicações foi em 2017 com 38 depósitos, como pode ser verificado na **Figura 1**. Esses dados permitem constatar que as pesquisas sobre espécies de *Annona* ainda é

algo que está em fase de desenvolvimento, se comparado com os depósitos de patentes referentes a outros assuntos ainda existem poucas patentes sobre o tema proposto na pesquisa.

**Figura 1-** Evolução do número de depósitos de patentes relacionadas as espécies de *Annona* no mundo.



Fonte: Autor, 2020.

Com relação a distribuição geográfica das patentes depositadas verifica-se que o continente asiático é o que possui os maiores números de patentes depositadas sobre tecnologia de utilização de espécies de *Annona*, seguido pelo continente americano. Nos continentes África, Oceania e Antártida ainda não foram registradas patentes nessa área de pesquisa.

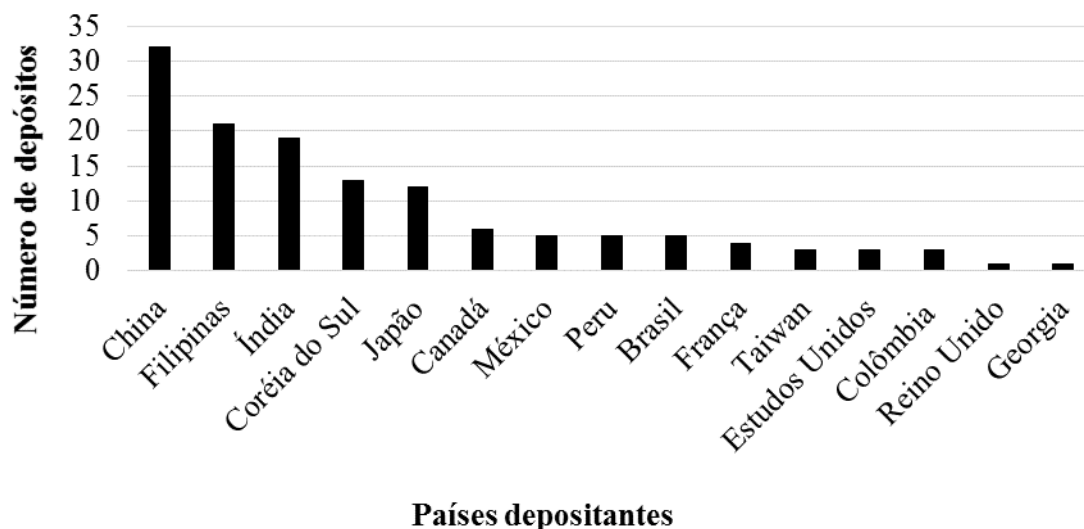
A **Figura 2** relaciona os principais países depositantes de patentes relacionadas ao termo *Annona*. Das 201 patentes recuperadas no geral, destaca-se na liderança do ranking a China com 32 depósitos (15,92%), as Filipinas com 21 depósitos (10,44%) e a Índia com 19 depósitos (9,45%).

O Brasil ocupa o nono lugar no ranking com depósitos de cinco patentes, a saber: BR102017003197A2 Método de produção de microestruturas e nanocápsulas de ciclodextrina contendo óleo da *Annona Vepretorum Mart*, BR10201602977A2 processo de extração de óleo de semente de graviola (*Annona muricata L.*) e produto obtido; BR102012026697A2 Fitoterápico

formulado a partir de um extrato acetônico padronizado obtido das folhas da *Annona muricata*; BR102018008313A2 Formulação inseticida/acaricida microemcapsulada por spray dryer de *annona squamosa* e *annona muricata* e a BR102014010066A2 Composição com atividade feromonal e uso no controle da broca de frutos anonáceas que se refere a formulações com atividade de feromônio sexual, eficazes no controle da broca de frutos (*Cerconota anonella*) de anonáceas (pinha, graviola e atemóia).

Mediante a análise dos dados obtidos nas bases de patentes, foi possível observar que o depósito de patentes não se restringe somente a empresas, algumas universidades também depositaram patentes como o caso do Paraná, da Bahia, do México, entre outras; isso ocorre porque as universidades investem em pesquisa e essas pesquisas geram o descobrimento e/ou aperfeiçoamento das tecnologias.

**Figura 2-** Principais depositantes.

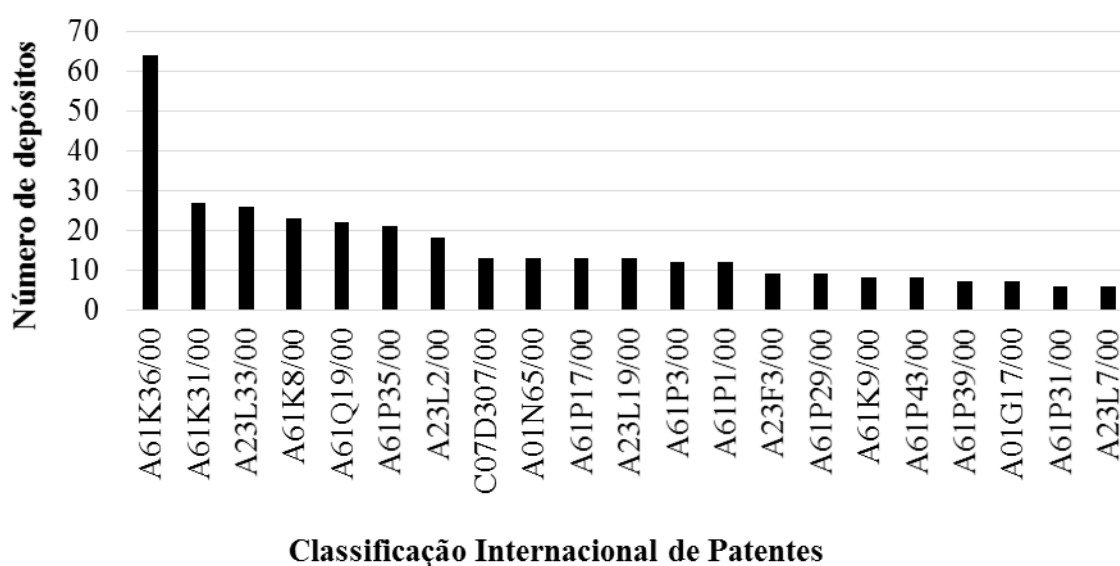


Fonte: Autor, 2020.

A Figura 3 mostra a relação do número de patentes depositadas para cada Classificação Internacional de Patentes (IPC), que é um sistema de classificação das patentes por símbolo de acordo com as diferentes áreas tecnológicas a que pertencem. A partir da análise desta figura, pode-se observar que o maior número de patentes de espécies de *Annona* se enquadraram em quatro das diversas grandes classificações de patentes A61

(Ciências médicas e veterinárias), A23 (gênero alimentício), C07 (Química) e A01 (Agricultura). Esse perfil de classificação para as patentes recuperadas indica o potencial do uso de *Annona* nas áreas de aplicação tecnológica. As classificações observadas por subgrupo foram: A61K 36 com 62 depósitos, A23L 33 com 26 depósitos, C07D 307 com 13 depósitos, A01N65 com 13 depósitos. Percebe-se que a maioria das patentes estão classificadas na Seção A que diz respeito a necessidades humanas.

**Figura 3-** Quantidade de publicações de acordo com a classificação IPC.



Fonte: Autor, 2020.

A **Figura 4** apresenta a distribuição das patentes por conceitos e pode-se perceber os diversos ramos de desenvolvimento das patentes sobre espécies de *Annona*. As patentes incluem processos de melhorias em medicamentos, alimentos, cosméticos e plantas. É um universo muito amplo já que as espécies de *Annona* podem ser utilizadas na indústria farmacêutica, energética, alimentícia, entre outras.

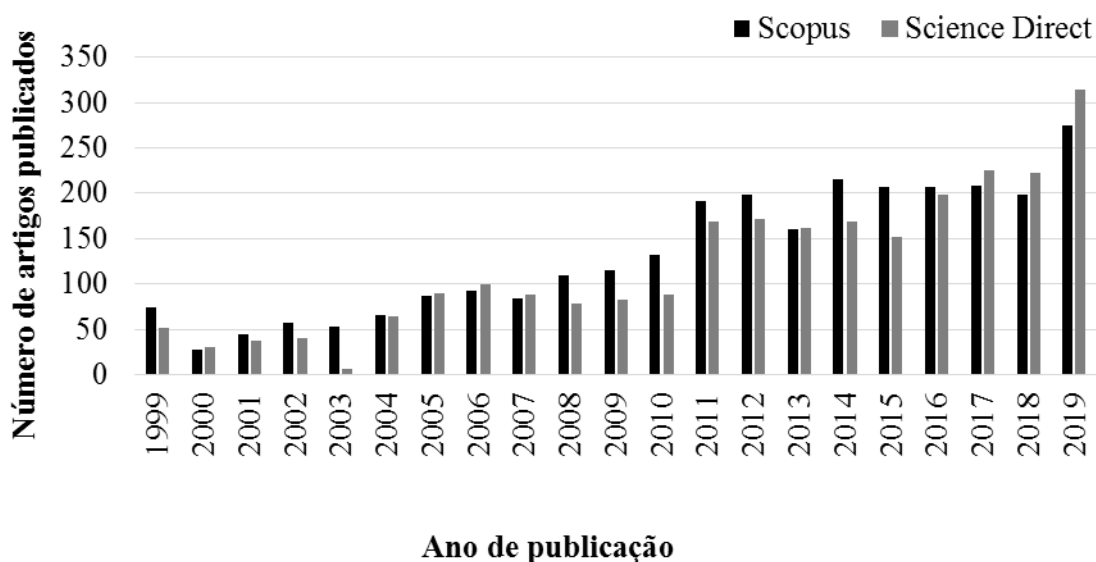
**Figura 4-** Distribuição dos resultados da pesquisa por conceitos.

Acetogeninas . Animais . Annona . Bebida . Câncer . Etanol. Flor . Folha . Comida .  
 Formulação . Fração . Frutas . Inflamação . Ingredientes . Sabor . Suco . Lactona . Pele.  
 Medicina . Leite . Muricata . Nutrição. Óleo . Squamosa . Açúcar . Chá . Tumor.  
 Substâncias. Vinho.

Fonte: Autor, 2020.

Como apresentado na tabela 2, as buscas de artigos nas bases Scopus e Science Direct resultaram na recuperação de 2795 e 1856 documentos, respectivamente, quando utilizado o termo “*Annona*”. Analisando a quantidade de artigos publicados por ano em cada uma das bases no período de 1999 a 2019, é possível observar o crescimento das publicações de artigos científicos com o passar dos anos. O ano com o maior número de publicações foi o ano de 2019, como pode ser visto na **Figura 5**.

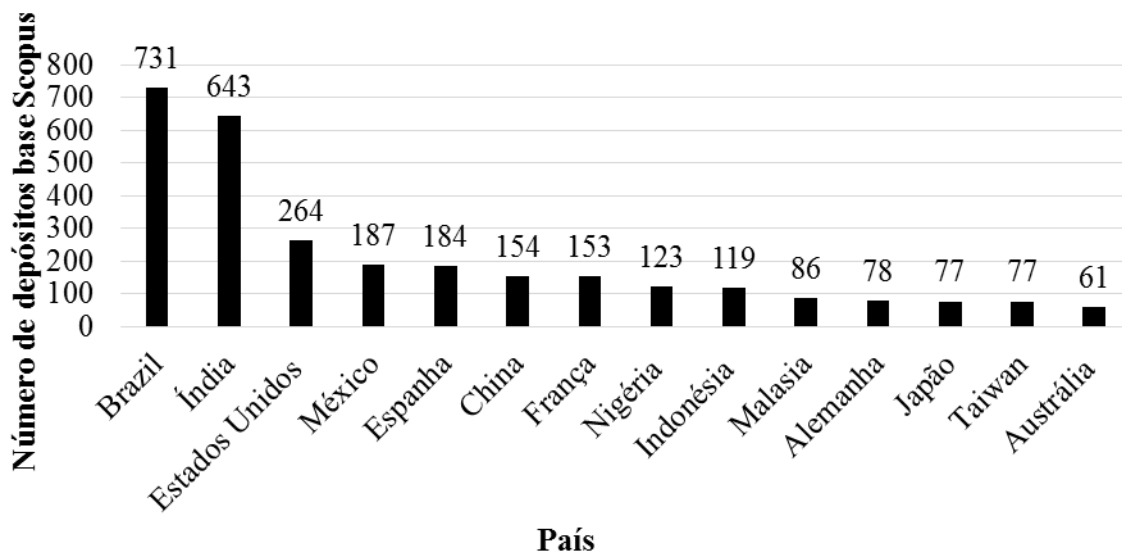
**Figura 5-** Perfil de publicações de artigos científicos por ano nas bases Scopus e Science Direct.



Fonte: Autor, 2020.

Dos 2795 artigos recuperados na base Scopus com a utilização do termo *Annona*, 731 são de origem brasileira. Esse resultado faz do Brasil o país que mais publicou utilizando o termo *Annona* em todo mundo, seguido pela Índia com 643, Estados Unidos com 264 México com 187 e China com 154, como mostra a **Figura 6**.

**Figura 6-** Ranking de países e publicação de artigos científicos na base Scopus.



Fonte: Autor, 2020.

Após serem analisados os títulos e resumos dos artigos constatou-se que existem poucos estudos visando o uso de semioquímicos de espécies de *Annona* como atraente no manejo integrado de pragas.

Essa liderança em publicações de artigos não corrobora com a quantidade de depósitos de patentes, onde o país fica em nono lugar como observado na tabela **Figura 2**.

#### 4.4 CONCLUSÃO

A presente revisão patentária e bibliográfica indicou o crescente número de depósitos de patentes e publicação de artigos científicos, ambos envolvendo espécies de *Annona*. Esse fato culmina na prospecção tecnológica sinalizada pelo interesse mundial tanto no desenvolvimento de produtos à base de espécies de *Annona* como no desenvolvimento de pesquisas científicas sobre o tema. O mercado das anonáceas não converge apenas para a produção de bioinseticidas, o mercado farmacêutico e alimentício também é bem difundido.

O Brasil foi um dos países com pouco destaque no número de patentes publicadas sobre espécies de *Annonas*, mas com alto índice de artigos publicados envolvendo o tema. Isso mostra o interesse do país em proporcionar pesquisa e conseqüente surgimento de novas tecnologias que possam complementar ou otimizar às que já existem e a análise de patentes

pode identificar as possibilidades de mercado e as suas ramificações mais promissoras.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J. F.; LEONEL, S.; NETO, J. P. Adubação organomineral e biofertilização líquida na produção de frutos de pinheira (*Annona squamosa* L.) no submédio São Francisco, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 4, 2008.

BACHMANN, G. E. *et al.*, sexual behavior and pheromone emission is enhanced by exposure to guava fruit volatiles in *Anastrepha fraterculus*. **PLoS One**, v. 10, n. 4, 2015.

BLANDE, J. D. Plant communication with herbivores. In: **Advances in Botanical Research**. Academic Press, p. 281-304, 2017.

BRAGA SOBRINHO, Raimundo. Integrated production of Annonaceae in Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. SPE1, p. 102-107, 2014.

DE MORAES, I. V. *et al.* Concentration of hydroalcoholic extracts of graviola (*Annona muricata* L.) pruning waste by ultra and nanofiltration: Recovery of bioactive compounds and prediction of energy consumption. **Journal of Cleaner Production**, v. 174, p. 1412-1421, 2018.

HARE, J. Daniel. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. **Annual review of entomology**, v. 56, p. 161-180, 2011.

INPI-INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL. Base de dados on-line. [2020]. Disponível em: <https://gru.inpi.gov.br/pePI/jsp/patentes/PatenteSearchBasico.jsp>. Acesso em 10 Jan. 2020.

HORAS, V. R. (2009). ***Crociosema aporema (walsingham, 1914) (Lepidoptera: Tortricidae): resposta olfativa aos voláteis da soja e comportamento de acasalamento*** (Doctoral dissertation, Dissertação de Mestrado. Curitiba (Entomologia, PGCB). Universidade Federal do Paraná.

LOPES, E. B. *et al.* Preferência de oviposição de *Ceratitis capitata* em tangerina (*Citrus reticulata*) sob condições de laboratório. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v.3, n.1, p.41-45, fev. 2009.

MARTELELLO, L. A. P; IDE, C. D. **Pinha- informações básicas**. Inform. Técnico, PESAGRO-RIO, dezembro 2008.

MICHELETTI, S., *et al.* Controle de *Cerconota anonella* (Sepp., 1830) (Lepidoptera: Oecophoridae) e de *Bephratelloides pomorum* (Fab.) (HYM.: Eurytomidae) em frutos de graviola (*Annona muricata* L.). **Rev. Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 722-725, 2001.

NAVA, D. E. **Comportamento de oviposição, bioecologia e subsídios para o controle biológico de *Stenoma catenifer* Walsingham, 1912 (Lepidoptera: Elachistidae)**. 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, M. A. S., *et al.* Incidência de danos da Broca - do - fruto da graviola no Distrito Federal. **Embrapa Cerrados-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2001.

OLIVEIRA, A. D. S., *et al.* Efficacy of insecticides in fruit borer control and residues on sugar apple fruit. **Revista Ceres**, v. 64, n. 2, p. 132-137, 2017.

PATENTINSPIRATION. Base de dados on-line. [2020]. Disponível em: <https://app.patentinspiration.com/#report/d12a63477544/filter>. Acesso em 09 Jan. 2020.

RIFFEL, A. *et al.* **O Dialeto das plantas**. 20 de abril de 2018. Disponível em < <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BR20101880197> >. Acessado em 20 de jan de 2019.

SCIENCE DIRECT. Base de dados on-line. [2020]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/search?q=annona>. Acesso em 12 Jan. 2020.

SCOPUS. Base de dados on-line. [2020]. Disponível em: <https://www.scopus.com/search/form.uri?display=basic>. Acesso em 12 Jan. 2020.

SOBHY, I. S., *et al.* The prospect of applying chemical elicitors and plant strengtheners to enhance the biological control of crop pests. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1639, 2014.

STRAPASSON, P. **Percepção química de *Grapholita molesta* (BUSCK) (Lepidoptera: TORTRICIDAE) a substâncias alimentares e voláteis de maçã: resposta quimiotáxica, eletrofisiológica e monitoramento em pomres de macieira com confusão sexual**. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

WIPO. Base de dados on-line. [2020]. Disponível em: <https://www.wipo.int/portal/en/index.html>. Acesso em 11 Jan. 2020

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

ZHU, J.; PARK, K. Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*. **Journal of chemical ecology**, v. 31, n. 8, p. 1733-1746, 2005.



**5. Capítulo II – BIOLOGIA MOLECULAR E ANÁLISE DAS SENSILAS  
ANTENAS DE *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Depressariidae)**

**BIOLOGIA MOLECULAR E ANÁLISE DAS SENSILAS ANTENAS DE  
*Cerconota anonella* (Lepidoptera: Depressariidae)**

**Resumo**

A ordem Lepidoptera é constituída por diversas espécies de importância econômica, inserida nela encontra-se a mariposa *Cerconota anonella* que se destaca como sendo uma das principais pragas que atacam as anonáceas, não há registro na literatura de estudos com base em dados moleculares e a nível de ultraestruturas para esta espécie no Brasil. Este trabalho objetivou, por meio da biologia molecular, construir árvores filogenéticas a fim de identificar a espécie e fazer a correlação com outras e através da microscopia eletrônica de varredura identificar as estruturas e distribuição das sensilas antenais de fêmeas de *C. anonella*. Os resultados mostraram que o DNA mitocondrial extraído do inseto proporcionou uma boa resolução filogenética, quando comparado com os dados do NCBI. Um total de nove tipos de sensilas foram identificadas nas antenas: caética, tricóide, coelocônica, auricílicas, campaniforme, basicônica, estilocônica, esquamiforme e furcata. Além disso, as possíveis funções da sensila antenal foram discutidas. Estes resultados contribuem para a compreensão das funções das antenas no comportamento da *C. anonella*, na elucidação da identificação da espécie e estabeleceu uma base para futuros estudos funcionais dessas sensilas para esta praga de importância econômica.

**Palavras-chave:** Receptores; Molecular; Tricóide.

## 5.1 INTRODUÇÃO

A ordem Lepidoptera é representada pelas borboletas e mariposas que possuem hábito de voo, respectivamente, diurno e a outra noturno, formando a segunda maior ordem de insetos (MARTINEZ; ROCHA-LIMA, 2020; VIEIRA, 2020).

Esta ordem formada por mais de 150.000 espécies de borboletas e mariposas. São organismos que possuem metamorfose completa durante seu desenvolvimento (holometábolos), cujas asas, corpo e apêndices são cobertos por escamas pigmentadas ou cerdas em forma de pelo (FREITAS; MARINI-FILHO, 2011).

A evolução desta ordem apresenta recentemente estudos com relação a base em dados de DNA, facilitando os estudos de genômica comparativa e pesquisa básica que leva a novas abordagens baseadas em genoma para biologia, ajudando na agricultura ao nível de controle de espécies de pragas.

Os primeiros genomas de Lepidoptera totalmente sequenciados relatados na literatura foram da mariposa da seda *Bombyx mori*, servindo como modelo para estudos de proteômica e genômica. (HECKEL, 2003).

Uma ferramenta de apoio molecular é a técnica de DNA barcoding (código de barra de DNA), que se baseia na sequência do gene da subunidade I da Citocromo C oxidase (COI) localizado no DNA mitocondrial, sendo um sistema “bioidentificador”, parecido com os códigos de barras universais (CARVALHO *et al.*, 2008). Este segmento apresenta um ótimo potencial informativo para a identificação de espécies de diferentes grupos de animais ou insetos.

Como a maioria das mariposas é noturna ou crepuscular, elas desenvolveram uma alta dependência do estímulo olfativo, sendo indiscutivelmente a modalidade sensorial mais importante na busca por parceiros, seleção por sítios de oviposição e forrageamento (SPATHE *et al.*, 2013).

Os insetos, ao longo do tempo desenvolveram uma alta sensibilidade e seletividade para detecção de odores. Seu sistema olfativo permite identificar os voláteis emitidos pelas plantas para localizar plantas adequadas como hospedeiros e evitar hospedeiros inadequados (BRUCE; PICKETT, 2011).

Nossa compreensão da evolução funcional desses receptores é ainda limitada (HOU *et al.*, 2020).

A antena é o principal órgão sensorial dos insetos abrigando diferentes tipos de sensilas utilizadas para detectar sinais químicos, movimento, umidade e temperatura (HANSSON; STENSMYR, 2011; SCHNEIDER, 1964).

Existem dois tipos principais de antenas: as segmentadas (possui segmentos com aproximadamente a mesma forma e músculos em todos os segmentos, exceto o distal) e as flageladas (possui dois segmentos basais, o escapo e o pedicelo, e um flagelo geralmente composto de muitos segmentos) são estruturas especializadas para a detecção de moléculas de odor (SCHNEIDER, 1964).

As antenas podem variar em comprimento, morfologia, número de segmentação, o tamanho do segmento individual em diferentes insetos ou diferentes sexos da mesma espécie, a incidência, densidade, tipos e distribuição de sensilas e outros aspectos que estão relacionados à sua função também podem diferir muito entre as diferentes espécies (HAO; SUN; LIU, 2020).

Em 1964, Schneider classificou as sensilas nos insetos. O reconhecimento de informações ambientais como, odores, sabores, tato, se concentram nas antenas, que são compostas por numerosas estruturas chamadas sensilas, as quais se distribuem praticamente por todo o corpo, porém se concentrando principalmente nas antenas, aparato bucal e pernas (GOMES *et al.*, 2019).

As sensilas presentes nas antenas tem papel fundamental no reconhecimento e localização do hospedeiro, acasalamento e outros comportamentos em toda a sua vida útil (HAO; SUN; LIU, 2020). Elas são divididas em diferentes tipos com base em sua estrutura (poros e propriedades de parede) e morfologia (YUVARAJ *et al.*, 2018).

Conhecer a função de um receptor é importante para compreender seu papel na ecologia química do inseto e na evolução da especialização olfativa (HOU *et al.*, 2020).

As antenas detectam e discriminam uma ampla diversidade de estímulos. Os odores não podem ser classificados por um parâmetro simples, a complexidade da sua identidade representa um desafio que é atingido através

do uso de muitos receptores de odores. A discriminação depende da codificação combinatória e das interações em múltiplas etapas do processamento olfativo (SU *et al.*, 2009).

O processamento de informação se inicia quando moléculas de odor presentes no meio ambiente atingem a cutícula das antenas, penetrando através dos canais e poros, subseqüentemente, se ligam aos quimiorreceptores e proteínas expressas nos dendritos dos neurônios sensoriais olfativos (NSOs). A ligação das moléculas de odor aos quimiorreceptores inicia a transdução de sinal nos NSOs e pode levar à despolarização deles. Os NSOs respondem à presença dos odores gerando potenciais de ação cuja frequência dependerá da qualidade, da quantidade e da duração do estímulo olfativo (HALLEM; CARLSON, 2006; KAUPP, 2010).

A capacidade que os insetos têm em fazer as associações olfativas através das sensilas é extremamente vital para sua sobrevivência. Compostos como o indol são ofensivos em altas concentrações, mas fornecem um odor agradável na forma diluída (ROSENKRANZ *et al.*, 2016).

Assim como o estudo das estruturas das antenas é importante para entendermos a comunicação entre inseto-planta e inseto-inseto. A investigação do DNA dos insetos, serve de base para a identificação da espécie.

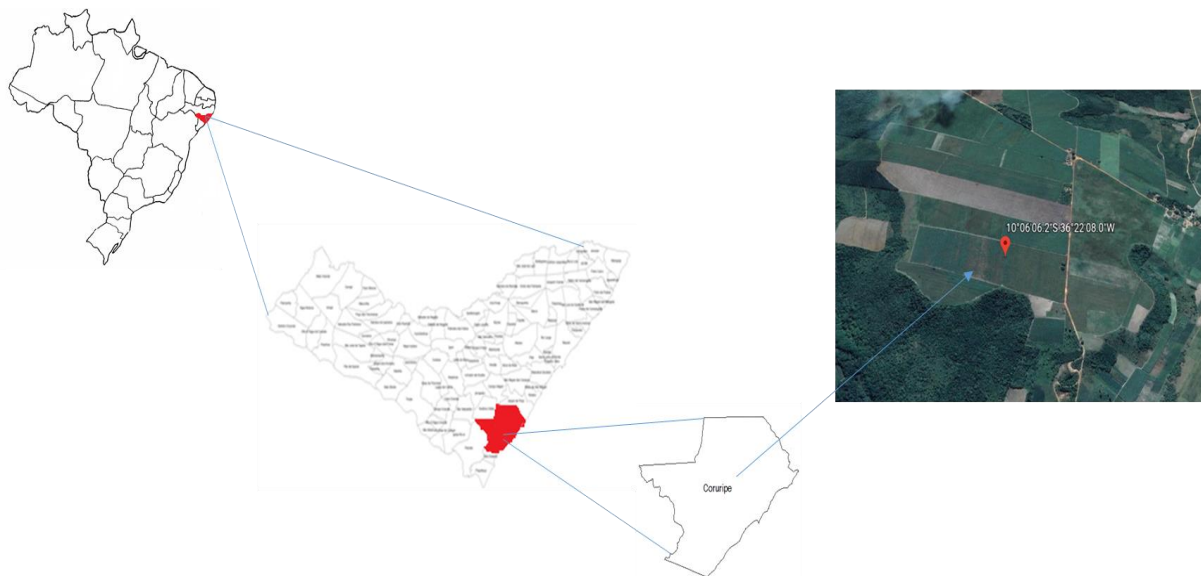
O presente estudo tem um papel importante, uma vez que fornecerá as primeiras informações fundamentais sobre a estrutura das sensilas presentes nas antenas da *C. anonella*, bem como a investigação do DNA desta espécie.

## **5.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.2.1 Obtenção do Insetos:**

Frutos brocados (com sinais de ataque da *C. anonella*) de *A. muricata* (graviola) em diferentes estágios de maturação (verde, intermediário e maduro), foram coletados em pomares, localizado em Pindorama- Cocuripe (**Figura 1**).

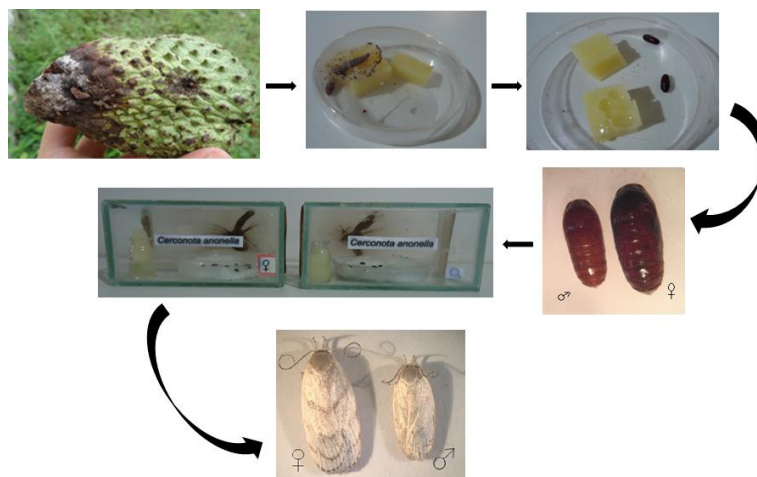
**Figura 1-** Localização de Pindorama- Coruripe.



Fonte: Autor, 2019.

Em seguida, levados ao Laboratório de Ecologia Química- UFAL. Os frutos brocados permaneceram em gaiolas. Os insetos adultos emergidos nesta situação ficaram em câmaras de acasalamento para postura de ovos em sala climatizada com fotoperíodo invertido. As lagartas de *C. anonella* removidas dos frutos brocados foram mantidas com dieta artificial de realimentação, em laboratório para criação até obtenção de pupas e adultos (**Figura 2**). As fêmeas foram utilizadas para fazer a microscopia e a biologia molecular.

**Figura 2-** Obtenção e manutenção dos insetos.



Fonte: Autor, 2019.

### **5.2.2 Extração de DNA, Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento**

O DNA genômico foi extraído das patas de cada indivíduo usando o método baseado na lise celular por SDS modificado (LUQUE *et al.*, 2002). O DNA foi extraído de indivíduos da espécie morfológicamente identificada. Uma região genica denominada COI foi amplificada usando primer LepF (5'-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3 ') e o primer reverso LepR (5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAATCA -3 ') (FOLMER *et al.*, 1994). Cada amplificação foi realizada em 30 µL que incluiu 1 µL de DNA, 2,5 µL 10 × tampão, 5 µL Q-solution 0,5 µL taq DNA Polymerase, 1,0 µL 2,5 mM dNTPmix, 0,5 µL 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL de cada primer (10 mmol) e de 18,5 µL ddH<sub>2</sub>O.

Os parâmetros da PCR foram 95° C durante 3 min e 35 ciclos de 94 ° C durante 30 s, 51 ° C (para COI) por 40 s e 72 ° C por 60 s, seguido por uma etapa final de extensão de 72 ° C por 10 min. Para os produtos de PCR obtidos foram realizados corridas em gel de agarose a 1,0 % usando brometo de etídeo e visualizado em um sistema de imagem em gel. Este mesmo procedimento foi realizado usando o primer LepF e MLepR. Os produtos de PCR mostrando bandas claras positivas foram purificados usando QIAquick® PCR Purification kits (de acordo com o protocolo dos fabricantes). Um máximo de duas PCR amostras positivas da espécie foram sequenciadas na Macrogen inc. (Korea), Seoul, Coreia do sul.

### **5.2.3 Análise das sequências de DNA**

As sequências de nucleotídeos de cada isolado foram montadas com o software Codon Code Aligner v. 6.0.2 ([www.codoncode.com](http://www.codoncode.com)) (Codon Code Corporation, Dedham, Massachusetts, USA). O arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas, foram corrigidos por comparação das sequências senso e anti-senso. Sequências parciais obtidas para o gene COI foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLASTn e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante do GenBank, para determinar as espécies com as quais compartilharam maior identidade de sequência. Alinhamentos múltiplos das sequências nucleotídicas foram realizadas utilizando a ferramenta MUSCLE

(LARKIN *et al.*, 2007), implementado pelo programa MEGA X (TAMURA *et al.*, 2018). Sequências de espécie de *Cerconota anonella* oriundas de estudos anteriores, disponíveis no GenBank, (**Tabela 1**), foram incluídas nas análises.

**Tabela 1-** Números de acesso GenBank das sequências de *Cerconota anonella* utilizadas nas análises filogenéticas.

<b>Espécie</b>	<b>Voucher</b>
<i>Cerconota anonella</i>	AL219005
<i>Cerconota anonella</i>	AL219006
<i>Cerconota anonella</i>	SG-BCISP-6647
<i>Cerconota anonella</i>	SG-BCISP-3821
<i>Cerconota anonella</i>	SG-BCISP-72
<i>Cerconota anonella</i>	SG-BCISP-6641
<i>Cerconota anonella</i>	SG-BCISP-809-13
<i>Cerconota anonella</i>	BCISP-808-13
<i>Cerconota anonella</i>	BCISP-787-13
<i>Cerconota anonella</i>	BCISP-2708-15
<i>Cerconota anonella</i>	BCISP-2613-15
<i>Cerconota anonella</i>	BCISP-1118-13
<i>Cerconota anonella</i>	BCISP-171-11
<i>Cerconota anonella</i>	BCISP-788-13
<i>Cerconota anonella</i>	BCISP-806-13
<i>Cerconota anonella</i>	SG-BCISP-3821
<i>Cerconota anonella</i>	BCISP-807-13

As relações filogenéticas foram inferidas pelo método de inferência Bayesiana (IB) utilizando o método de Cadeia de Markov de Monte Carlo (MCMC). Os conjuntos de dados COIa e COI b (individuais e concatenados) foram reconstruídas no portal CIPRES (MILLER *et al.*, 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (RONQUIST *et al.*, 2012). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado para cada região genômica usando MrModeltest v. 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004). Análises foram rodadas por 10 milhões de gerações usando quatro cadeias e amostrando a cada 1.000 gerações, para



um total de 10.000 árvores. As árvores filogenéticas geradas foram visualizadas e editadas nos programas FigTree v. 1.4 ([ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree](http://ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree)).

#### **5.2.4 Preparação das antenas**

Após a separação da cabeça e do corpo com auxílio de tesoura oftalmológica, as cabeças foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão de fosfato de sódio a 0,1M por 10 minutos até o momento da desidratação em etanol. Decorrido o período de fixação, realizou-se três lavagens de 10 minutos cada (sempre agitando por alguns segundos os microtubos para que as partículas de sujeira fossem separadas das antenas) seguido da desidratação em solução de etanol nas concentrações de 70, 80 e 90% por 5 minutos em cada uma.

#### **5.2.5 Análise superficial das antenas utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Microscopia, do Instituto Federal de Alagoas, Campus Maceió. A antena (previamente preparada) foi fixada com fita adesiva de carbono dupla face condutora e montada em stubs com 1,0 cm de diâmetro. O material foi transferido para um metalizador QUORUM Q150R ES para ser coberto com uma camada de ouro. Uma corrente de 45 mA foi aplicada por 200s. O material foi analisado no modelo SEM TESCAN VEGA3 com distância de trabalho de 15,97mm e com aceleração de tensão igual a 20kV.

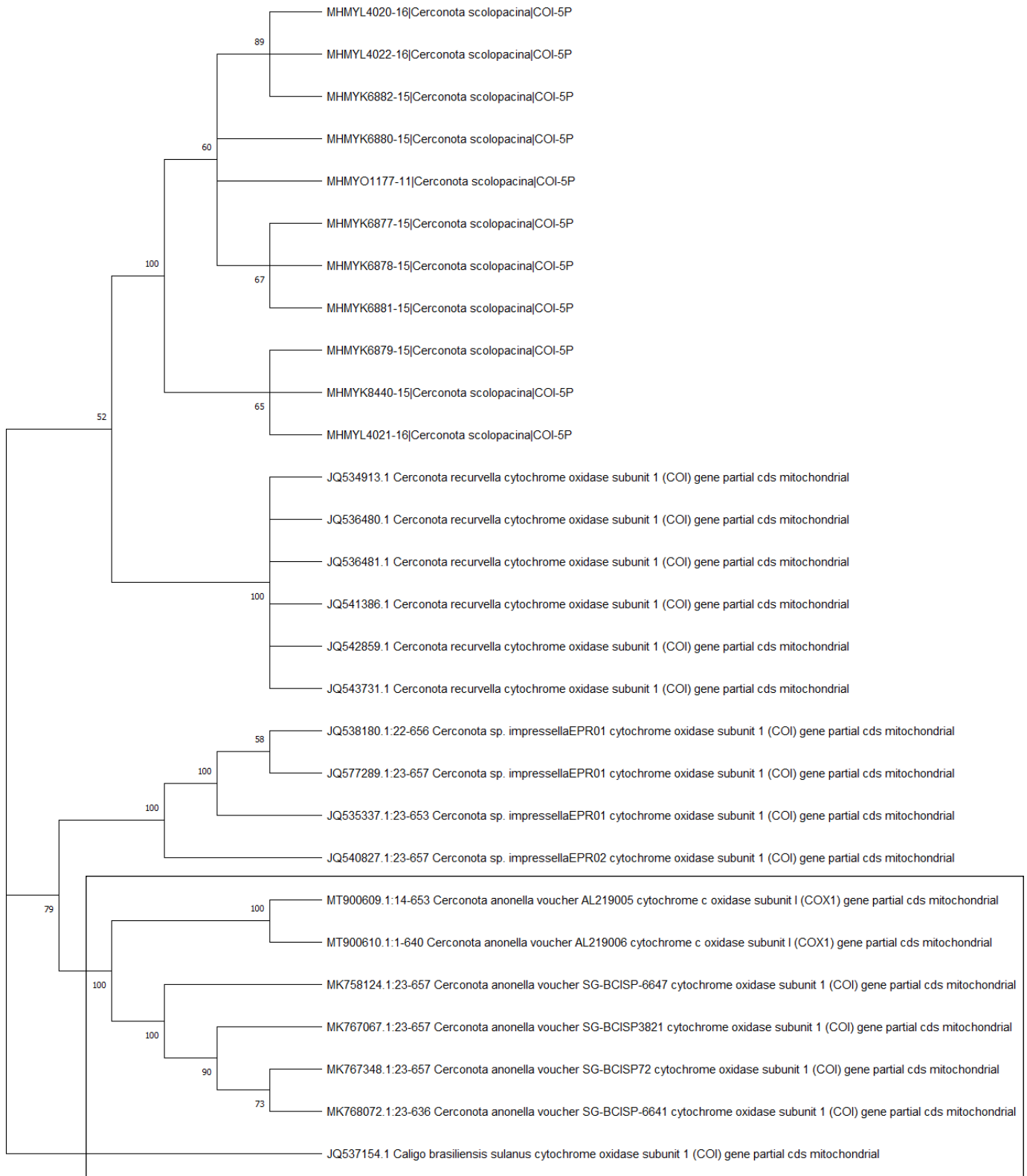
### **5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

#### **5.3.1 Biologia molecular**

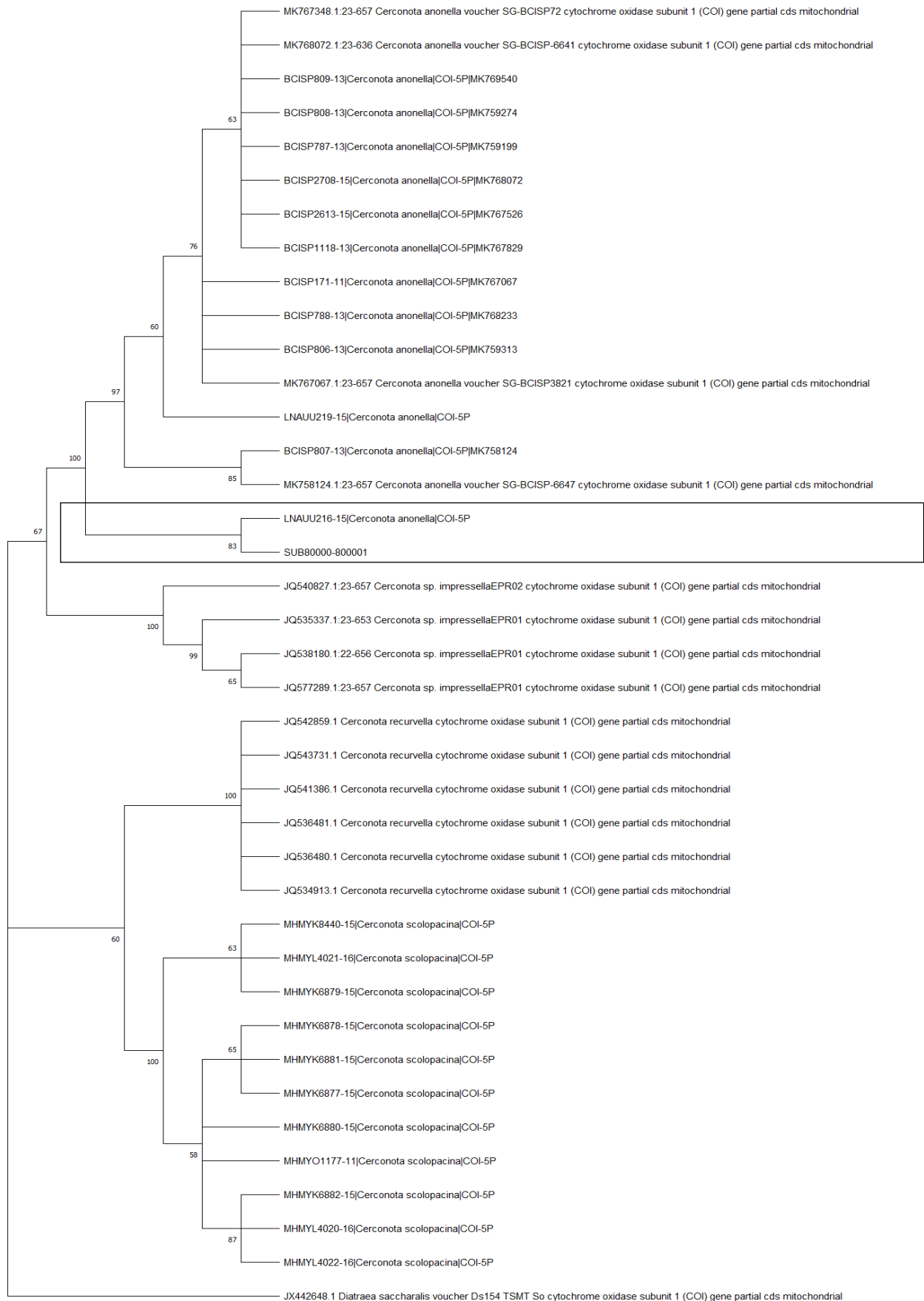
Na reconstrução filogenética de inferência Bayesiana para os conjuntos de dados concatenados, foram utilizados os seguintes modelos evolutivos: TN93+G+I (COIa) e GTR+I+G (COIb) para os alinhamentos de sequências nucleotídicas. *Caligo brasiliensis sulanu* (JQ 537451) e *Diatraea\_saccharalis* (JX442648.1) foram utilizados como outgroup.

Após uma análise utilizando a região COI, foram verificados que os 4 haplótipos pertencem a espécie *Cerconota anonella*. Na árvore de Inferência Bayesiana para o conjunto de dados concatenados (COIa e COIb) observou-se que as espécies identificadas formaram grupos bem suportados. Na árvore 1 (**Figura 3**), o material sequenciado MT 900609 e MT 900610 agruparam com a espécie *Cerconota anonella* MK758124, MK767067, MK767348, MK768072. Na árvore 2 (**Figura 4**), o material sequenciado SUB800000 e SUB800001) agruparam no mesmo clado com a espécie *Cerconota anonella* LNAUU216\_15.

**Figura 3-** Árvore filogenética de inferência Bayesiana com base nas seqüências combinadas das regiões COIa e COIb. Utilizando o *Caligo brasiliensis sulanu* como outgroup.



**Figura 4-** Árvore filogenética de inferência Bayesiana com base nas seqüências combinadas das regiões COIa e COIb. Utilizando a *Diatraea\_saccharalis* como outgroup.



Os isolados caracterizados nestes estudos estão destacadas em negrito (**Figuras 3 e 4**).

A identificação dessa espécie de *Cerconota* por meio molecular, auxilia na determinação do perfil genético, na caracterização e no monitoramento das populações desse inseto da ordem Lepidoptera.

O registro do material MT 900609 e MT 9000610 sequenciado, trata-se do primeiro registro brasileiro da espécie *C. anonella*, o mesmo foi depositado no banco de dados do NCBI, o documento do registro está anexado a esta tese.

As amostras estudadas do gênero *Cerconota*, denominadas MT 900609, MT 9000610, SUB800000 e SUB 800001 apresentaram respectivamente 100% e 83% de probabilidade de ser da espécie *anonella*, isso é evidenciado devido à proximidade desta com o agrupamento *C. anonella*, se diferenciando assim das demais.

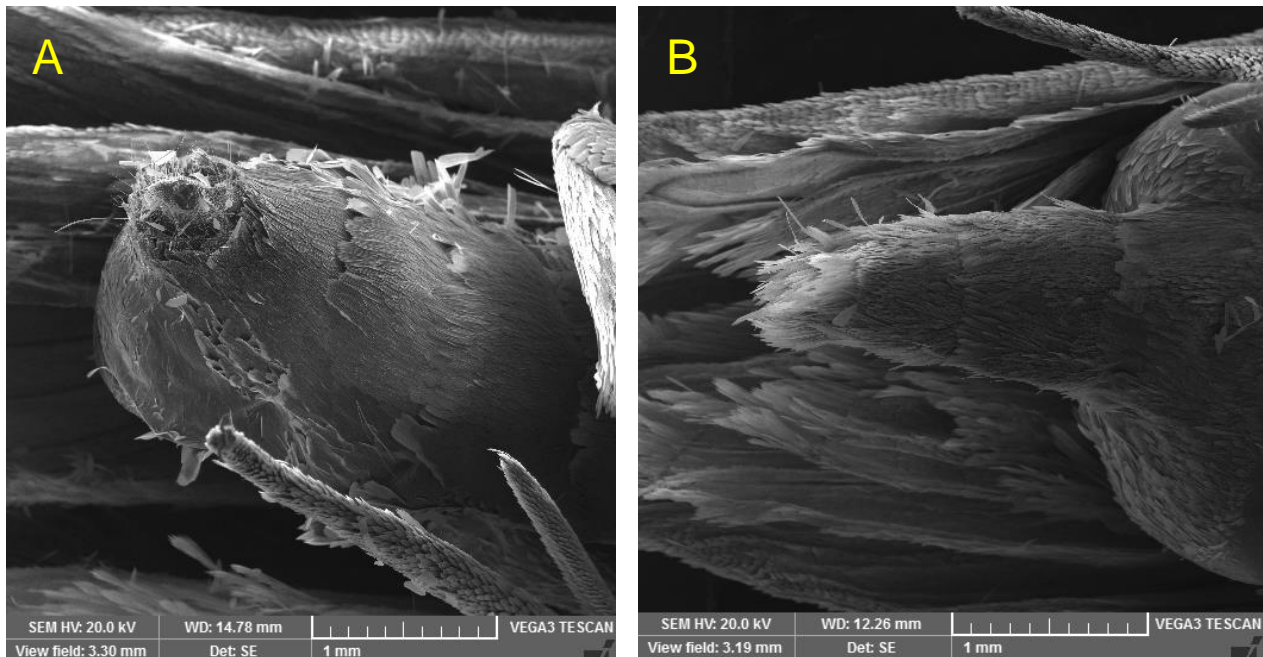
A identificação por barcode utilizando a sequência do COI é capaz de fornecer a distribuição da divergência genética das espécies (PEREIRA et al., 2013). Este fato pode ser visualizado nas árvores filogenéticas construídas, onde várias espécies do gênero *Cerconota* foram utilizadas.

As análises de *DNA* servem como um método de identificação que vem utilizando métodos filogenéticos nas suas análises (NICOLALDE-MOREJÓN et al., 2011).

### 5.3.2 Morfologia geral das antenas

É possível diferenciar machos e fêmeas em fase adulta pela parte inferior abdominal, as fêmeas (A) apresentam o abdômen mais arredondado, já o macho (B) apresenta o abdômen mais pontiagudo, como ilustra **Figura 5**.

**Figura 5** – Micrografia mostrando a diferenciação de fêmeas e machos de *C. anonella*.



Nota: Abdômen da fêmea (A) e abdômen do macho (B).

Fonte: Autor, 2020.

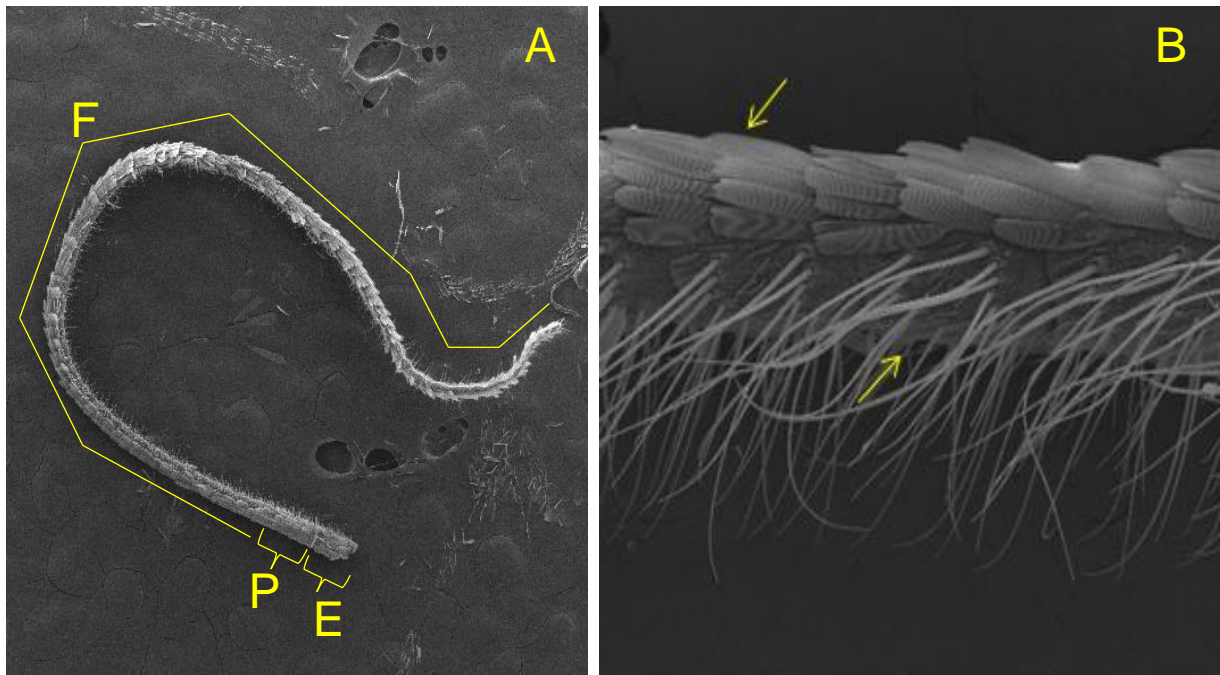
### 5.3.1 Morfologia geral das antenas

As antenas nos insetos funcionam como receptores sensoriais para monitorar as informações do ambiente físico e químico. Dessa maneira apresentam mecanosensores e diversos tipos de receptores capazes de perceber estímulos olfativos, de temperatura, de umidade e de contato químico. Portanto, as antenas constituem o principal apêndice sensorial nos insetos.

As antenas são estruturas segmentadas, de modo geral apresentando três segmentos, escapo, pedicelo e flagelo (região longa, dividida em antenômeros é onde encontramos o maior número de sensilas). As superfícies do escapo, pedicelo e os flagelômeros iniciais são cobertas por escamas sobrepostas.

Os diversos segmentos escapo, pedicelo e flagelo (A) apresentam estruturas quitinosas, denominadas sensilas, que possuem morfologia diversa (LORENZO; MELO, 2012). Na região dorsal e na parte superior da área sensilar a antena está coberta por escama (B), como mostra a **Figura 6**.

**Figura 6** - Descrição geral para as antenas de fêmeas de *C. anonella*.



Nota: Escapo (E), pedicelo (P), Flagelo (F).

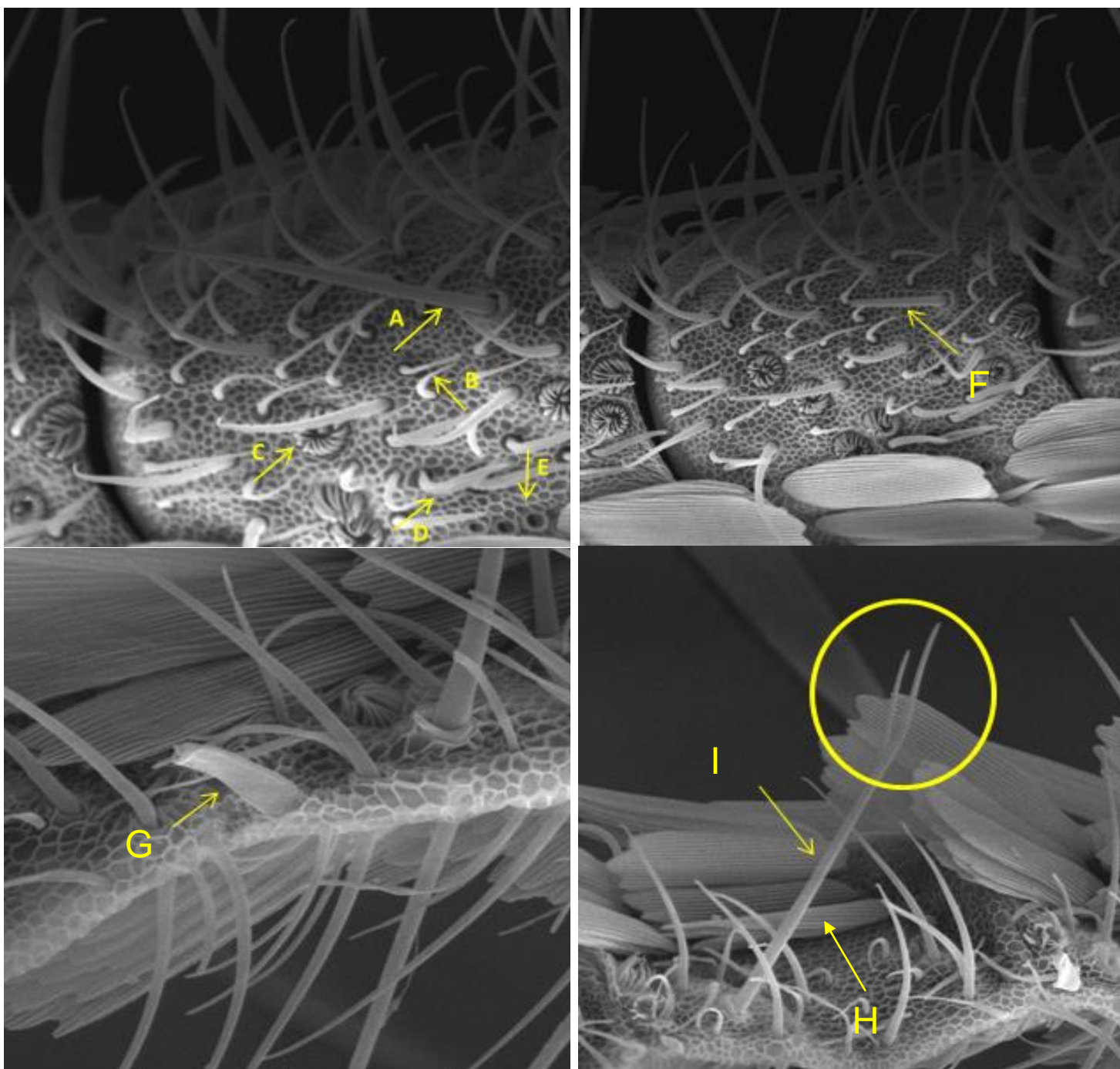
Fonte: Autor, 2020.

Em sua grande maioria, as sensilas encontradas ao longo do comprimento do flagelo estão envolvidas de detecção de odores. Já as que estão presentes no escapo e pedicelo exercem a função de mecanorreceptores, permitindo ao indivíduo monitorar o movimento das antenas (LIU *et al.*, 2013).

### 5.3.3 Tipos das sensilas antenais

Foram identificados nove tipos de sensilas nas antenas de fêmeas de *C. anonella*, conforme a **Figura 7**.

**Figura 7** - Sensilas presentes nas antenas das fêmeas de *C. anonella*.



NOTA: Sensilas: caética (A), tricóide (B), coelocônica (C), auricílicas (D), campaniformes (E), basicônica (F), stilocônica (G), esquamiforme (H) e furcata (I).

Fonte: Autor, 2020.

As sensilas identificadas como: caética, tricóide, coelocônica, auricílicas, campaniformes, basicônica, stilocônica, esquamiforme e furcata estão localizadas na área sensilar e região dorsal.



Sensilas caéticas são retas distribuídas sobre o flagelo com estrutura semelhante a cerdas, têm uma forma pontiaguda e são largas na base, sendo do tipo vertical ou com uma inclinação em direção à superfície da antena. Elas estão distribuídas ao longo do flagelo e são encontradas principalmente entre as sensilas tricóides.

Sensilas tricóides são curtas quando comparadas às sensilas caéticas, possui a base larga e seu diâmetro diminui de tamanho à medida que se aproxima do ápice. São as mais comuns e abundantes em espécies da ordem Lepidoptera, muito utilizadas em estudos comportamentais devido à sua função quimiorreceptora (FORSTNER *et al.*, 2009; KAISLING, 2009). A sensibilidade presente nesta sensila, se destina a recepção olfativa de voláteis de plantas hospedeiras e feromônios sexuais (CÔNSOLI; KITAJIMA; PARRA, 1999). Estas sensilas são de grande importância nos estudos eletrofisiológicos com *C. anonella*, indicando qual composto elicia uma mudança comportamental em machos e fêmeas de *C. anonella*.

A espécie *Coleophora obducta* (Meyrick, 1931) (Lepidoptera: Coleophoridae) apresenta sensilas tricóide distribuídas sobre a superfície dorsal do flagelo, sendo mais numerosas nas antenas de fêmeas dessa espécie (YANG; YAN; LIU, 2009).

Hillier *et al.*, (2006) demonstraram que na sensila tricóide da fêmea de *Heliiothis virescens* F. (Noctuidae) existem neurônios que são responsáveis pela detecção dos odores de plantas (GRULA; TAYLOR, 1980). YAN e colaboradores (2017) também constatou em seus estudos sobre as antenas de *Plutella xylostella* (L.) que as sensilas tricóides podem estar envolvidas na detecção de feromônios sexuais por machos e nas fêmeas podem responder aos voláteis da planta hospedeira.

Sensilas coelocônicas aparecem em pequenos grupos e em áreas específicas das antenas, possui estruturas lisas e pontiagudas com uma base circular formada por estruturas curtas que circunda uma sensila central, se assemelhando a uma flor.

São frequentemente receptores de temperatura, umidade e CO<sub>2</sub> (HARTENSTEIN, 2005; YANG; YAN; LIU, 2009).

Sensilas auricilícas são menos abundantes, curtas e possui um eixo cuticular achatado, essas sensilas não são encontradas facilmente nas antenas

de fêmeas, têm uma superfície cuticular lisa com o aspecto de uma folha. Estudos anteriores relataram que a sensilla auricillica em *Cydia pomonella* eram comportamentalmente sensíveis aos voláteis de planta (ANSEBO *et al.*, 2005; XIANGQUN *et al.*, 2014).

Sensilas campaniformes apresentam a forma de discos planos ovais com poros observados em sua superfície, estão distribuídas em diferentes segmentos da antena. Possuem função mecanoreptoras. As formas de pequenos círculos apresentam pequena elevação nas bordas (FIALHO *et al.*, 2014).

Sensilas basicônicas possui um eixo cilíndrico e uma extremidade arredondada. Encontram-se distribuídas no centro e ao longo do flagelo, encontrando-se entre as sensilas tricoide. Este tipo de sensibilidade observada neste estudo também se assemelha ao observado em muitas outras famílias de Lepidoptera (CÔNSOLI; KITAJIMA; PARRA, 1999). A sensila basicônica atribui-se a função olfativa (CÔNSOLI; KITAJIMA; PARRA, 1999; CHINTA; DICKENS; BAKER, 1997).

Sensilas stilocônicas são estruturas curtas e robustas. De acordo com a literatura, a estrutura e a função dessas sensilas já foram bem estudadas e são consideradas receptores de temperatura e umidade. Foram encontradas em várias espécies de mariposa (FAUCHEUX, 1985; FAUCHEUX, 2006; CHANG *et al.*, 2015).

Sensilas esquamiformes distribuem-se nas antenas de fêmeas de *C. anonella* na área sensilar (região ventral). Na proximidade da área com escamas (região dorsal), essas sensilas parecem com escamas, são alongadas com a extremidade afilada. Sensilas esquamiformes foram amplamente encontradas nos lepidópteros, embora a forma e distribuição dessas sensilas sejam diferentes nas várias espécies de mariposas relatadas (CÔNSOLI, KITAJIMA; PARRA, 1999). Conseqüentemente, mais estudos eletrofisiológicos e comportamentais são necessários para elucidar sua função.

Sensilas furcadas são retas, com base larga e com a extremidade bifurcada. Em seu trabalho sobre sensilas antenais, YANG e colaboradores (2009) constataram também a presença dessa sensila em *Coleophora obducta* (Meyrick) (Lepidoptera: Coleophoridae).

## 5.4 CONCLUSÕES

O presente estudo comprovou mediante análises de biologia molecular a identificação da espécie como sendo *Cerconota anonella*, gerando os primeiros registros brasileiros da espécie na base NCBI, contribuindo assim para a diversidade da espécie.

Por microscopia eletrônica de varredura foi identificada e caracterizada a distribuição dos diferentes tipos de sensilas presentes nas antenas das fêmeas de *Cerconota*. Para confirmar informações sobre a função destas sensilas para a espécie em estudo, serão necessários mais estudos e a aplicação de outras técnicas, como o registro da sensila única que é usada em estudos funcionais de receptores odoríferos.

Em conclusão, foi possível fornecer informações úteis para os estudos biológicos, eletrofisiológicos, comportamentais e químicos, para melhor entender os mecanismos relacionados ao controle de diversos insetos, em especial, aqueles que causam danos a culturas de importância econômica e à saúde humana.

Estudos futuros devem ser realizados associando a morfologia das sensilas desta espécie e suas respostas fisiológicas, sendo necessários para melhor compreender os aspectos do sistema olfativo do inseto, verificando assim suas propriedades estruturais de relevância funcional.

## 5.5 REFERÊNCIAS

- ANSEBO, L. *et al.* Responses to sex pheromone and plant odours by olfactory receptor neurons housed in sensilla auricillica of the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 51, n. 10, p. 1066-1074, 2005.
- BRUCE, T. J. A; PICKETT, J. A. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects—finding the right mix. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1605-1611, 2011.
- CARVALHO, *et al.* Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). **Revista Brasileira De Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.215-219, 2008.
- CHANG, X. *et al.* Insight into the ultrastructure of antennal sensilla of *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 124, 2015.

CHINTA, S.; DICKENS, J. C.; BAKER, G. T. Morphology and distribution of antennal sensilla of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Palisot de beauvois)(Hemiptera: Miridae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 26, n. 1, p. 21-26, 1997.

CÔNSOLI, F. L. *et al.* Sensilla on the antenna and ovipositor of the parasitic wasps *trichogramma galloi* Zucchi and *T. pretiosum* Riley (Hym., Trichogrammatidae). **Microscopy research and technique**, v. 45, n. 4-5, p. 313-324, 1999.

FAUCHEUX, M. J. Morphology and distribution of antennal sensilla in the female and male clothes moth, *Tineola bisselliella* Humm.(Lepidoptera: Tineidae). **Canadian journal of zoology**, v. 63, n. 2, p. 355-362, 1985.

FAUCHEUX, M. J.; KRISTENSEN, N. P.; YEN, S. The antennae of neopseustid moths: Morphology and phylogenetic implications, with special reference to the sensilla (Insecta, Lepidoptera, Neopseustidae). **Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology**, v. 245, n. 2, p. 131-142, 2006.

FIALHO, M. C. Q. *et al.* A comparative study of the antennal sensilla in corbiculate bees. **Journal of Apicultural Research**, v. 53, n. 3, p. 392-403, 2014.

FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R.1994 DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.

FORSTNER, M.; BREER, H.; KRIEGER, J. A receptor and binding protein interplay in the detection of a distinct pheromone component in the silkworm *Antheraea polyphemus*. **International journal of biological sciences**, v. 5, n. 7, p. 745, 2009.

FREITAS A.V.L.; MARINI-FILHO O. J. Plano de Ação Nacional para Conservação de Lepidoptera Ameaçados de Extinção. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBIO, Brasília, 2011.

NCBI. Base de dados on-line. [2020]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>. Acesso em 30 Agost. 2020.

GOMES, G. *et al.* A Neurociência da percepção do Ambiente: estudos e aplicações.<[https://www.researchgate.net/profile/Guilherme\\_Gomes3/publication/323879448\\_A\\_Neurociencia\\_da\\_percepcao\\_do\\_ambiente\\_estudos\\_e\\_aplicacoes/links/5ab1003faca2721710febe1f/A-Neurociencia-da-percepcao-do-ambiente-estudos-e-aplicacoes.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Guilherme_Gomes3/publication/323879448_A_Neurociencia_da_percepcao_do_ambiente_estudos_e_aplicacoes/links/5ab1003faca2721710febe1f/A-Neurociencia-da-percepcao-do-ambiente-estudos-e-aplicacoes.pdf)> Acessado em 10 de maio de 2019.

HALLEM, E. A.; CARLSON, J. R. Coding of odors by a receptor repertoire. **Cell**, v. 125, n. 1, p. 143-160, 2006.

HANSSON, B. S.; STENSMYR, M. C. Evolution of insect olfaction. **Neuron**, v. 72, n. 5, p. 698-711, 2011.

HAO, Y.; SUN, Y.; LIU, C. Functional morphology of antennae and sensilla of *Hippodamia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae). **PloS one**, v. 15, n. 8, p. e0237452, 2020.

HECKEL, D. G. Genomics in pure and applied entomology, *Ann. Rev. Entomol.*, v. 48, p. 236–260, 2003.

HOU, X. *et al.* Functional characterization of odorant receptors from the moth *Eriocrania semipurpurella*: a comparison of results in the *Xenopus* oocyte and HEK cell systems. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 117, p. 103289, 2020.

KAISLING, K. The sensitivity of the insect nose: The example of *Bombyx mori*. In: **Biologically Inspired Signal Processing for Chemical Sensing**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 45-52.

KAUPP, U. B. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 188, 2010.

KUMAR S, *et al.* Mega x: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.*, v.35, p.1547–9, 2018.

LARKIN, M.A., *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, v.23, p.2947-2948, 2007.

LIU, X. *et al.* Ultrastructure of antennal sensilla of a parasitoid fly, *Pales pavidus* Meigen (Diptera: Tachinidae). **Micron**, v. 54, p. 36-42, 2013.

LORENZO, M. G.; MELO, A. C. A. Olfacção e Comportamento. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular**, v. 120, 2012.

LUQUE, C. *et al.* ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). **Hereditas**, Lund, v. 136, p. 251-253, 2002.

NCBI National Center for Biotechnology Information. < <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>> Acessado em 20 de abril de 2019.

MARTINEZ, N. M.; ROCHA-LIMA, A. B. C. A importância dos insetos e as suas principais ordens. **Unisanta BioScience**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2020.

MILLER, M.; PFEIFFER, W; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Gatew. Comput. Environ*, p.1–8, 2010.

NICOLALDE-MOREJÓN, F. *et al.* Character-based, population-level DNA barcoding in Mexican species of *Zamia* L. (Zamiaceae: Cycadales). **Mitochondrial DNA**, v. 21, n. sup1, p. 51-59, 2010.

PEREIRA, L. H. G *et al.* Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. **BMC genetics**, v. 14, n. 1, p. 20, 2013.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*, v.53, p.793-808, 2004.

RONQUIST F., *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.*, v.61, p.539–542, 2012.

ROSENKRANZ, M.; SCHNITZLER, J. Plant volatiles. **eLS**, p. 1-9, 2016.

SCHNEIDER, D. Insect antennae. **Annual review of entomology**, v. 9, n. 1, p. 103-122, 1964.

SPÄTHER, A. *et al.* Plant species-and status-specific odorant blends guide oviposition choice in the moth *Manduca sexta*. **Chemical senses**, v. 38, n. 2, p. 147-159, 2013.

SU, C.; MENUZ, K.; CARLSON, J. R. Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. **Cell**, v. 139, n. 1, p. 45-59, 2009.

VIEIRA, L. R. *et al.* Borboletas (Lepidoptera, Papilionoidea) em floresta estacional semidecidual do sul do estado de Minas Gerais, Brasil. **Nature and Conservation**, v. 13, n. 2, p. 14-25, 2020.

XIANGQUN, Y. *et al.* Ultrastructure of antennal sensilla of four skipper butterflies in *Parnara* sp. and *Pelopidas* sp. (Lepidoptera, Hesperidae). **ZooKeys**, n. 399, p. 17, 2014.

YAN, X. *et al.* Distribution patterns and morphology of sensilla on the antennae of *Plutella xylostella* (L.) - A scanning and transmission electron microscopic study. **Micron**, v. 103, p. 1-11, 2017.

YANG, H.; YAN, S.; LIU, D. Ultrastructural observations on antennal sensilla of *Coleophora obducta* (Meyrick) (Lepidoptera: Coleophoridae). **Micron**, v. 40, n. 2, p. 231-238, 2009.

**6. Capítulo III – FORMULAÇÃO, EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE  
COMPOSTOS VOLÁTEIS DE PLANTAS DE *Annona muricata* e *Annona  
squamosa*, EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO, ATRAENTES  
PARA A BROCA DOS FRUTOS *Cerconota anonella***

**FORMULAÇÃO, EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS  
VOLÁTEIS DE PLANTAS DE *Annona muricata* e *Annona squamosa*, EM  
DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO, ATRAENTES PARA A BROCA  
DOS FRUTOS *Cerconota anonella***

**RESUMO**

Os compostos orgânicos voláteis emitidos pelas plantas são responsáveis por induzirem inúmeras respostas no comportamento dos insetos. Este trabalho teve por objetivo extrair e identificar os compostos voláteis emitidos pelas *Annona muricata* e *Annona squamosa*, em diferentes fases fenotípicas sobre o comportamento de busca da *Cerconota anonella*. As análises químicas dos extratos de aeração da gravioleira e pinheira mostraram que há diferença na composição das misturas de voláteis liberadas nas fenofases consideradas preferenciais, floração e frutificação. As fêmeas foram atraídas para plantas antes mesmo da frutificação, incluindo a fase de floração, sendo a fase frutificada a preferencial. Não foram detectadas diferenças significativas quando comparados os extratos de plantas nos estágios de maturação preferenciais. Dentre as classes de compostos identificados por CG-EM foram encontrados terpenos, ésteres, álcoois, cetonas, aldeído. Em *A. squamosa* foram identificados 37 compostos no estágio florado e 44 no estágio frutificado. Para *A. muricata* foram identificados 23 e 15 compostos, respectivamente, no estágio florado frutificado. As análises eletroantenografia demonstraram a despolarização para os compostos  $\beta$ -Mirceno,  $\beta$ -ocimeno, benzoato de metila e o Linalol no extrato de pinheira para o estágio frutificado. Nos testes com as formulações das misturas dos compostos EAD ativos, em duas concentrações diferentes (1uL/mL e 10uL/ml), atraíram as fêmeas virgens acasaladas e não diferiu estatisticamente da atratividade para o extrato da pinheira no estágio frutificado.

**Palavras-chave:** Metabólitos; Formulação; Terpenos.



## 6.1 INTRODUÇÃO

No gênero *Annona* encontram-se espécies de grande importância, sendo plantas amplamente cultivadas e comercializadas no Brasil, tendo destaque a *Annona squamosa* L. (frutado-conde) e *Annona muricata* L. (Graviola). As plantas da família *Annonaceae* vem ganhando destaque por serem naturalmente bioativas.

As plantas emitem misturas complexas de compostos químicos que estão envolvidos em interações multitróficas, coordenação de respostas de defesa sistêmica e polinização (BLANDE, 2017).

Os COV's produzidos pelas plantas têm sido considerados de grande importância nas interações envolvendo plantas, pragas e inimigos naturais (VENDRAMIM, 2002). São compostos que possuem baixo peso molecular e são liberados por praticamente todas as partes das plantas (RIFFEL; DA COSTA, 2015).

A composição química de misturas de compostos orgânicos voláteis (COVs) emitida pelas plantas, transmite informações sobre a espécie, o genótipo de uma planta e os estresses bióticos e abióticos aos quais a planta foi submetida (DICKE; BALDWIN 2010).

Ao longo de seu ciclo de vida, a liberação dos COV'S das plantas varia consideravelmente com mudanças refletindo o estágio fenológico da planta (HARE, 2010).

Em várias espécies, a localização do hospedeiro é guiada pela trilha de compostos orgânicos voláteis produzidos por suas plantas hospedeiras, e a composição dos compostos voláteis parece ser importante nesse processo (BRUCE; PICKETT, 2011; SPATHE *et al.*, 2013).

O aroma das flores é constituído por uma mistura complexa de voláteis, que são produzidos através das três principais vias biossintéticas: os acetogênicos (derivados de ácidos graxos), mevalogênicos (isoprenóides) e também os aromáticos (benzenóides) (BERGSTROM, 2008).

Em seus estudos Matile e Altenburg (1988) relataram que a periodicidade dos odores das flores sofre mudança quando comparadas as flores na planta e removidas dela.

As plantas produzem uma grande diversidade de metabólitos que são responsáveis pelas inúmeras interações ecológicas e constituem uma base de estudos ecológicos e evolutivos nos estudos de defesa e comunicação das plantas (KESSLER, 2015).

Metabólitos secundários presente na natureza podem ser liberados por todas as partes das plantas, incluindo folhas, caule, raízes, flores, botões, sementes e outras (WESTON; DUKE, 2003). Podem ser classificados de acordo com sua estrutura esquelética de carbono e tipo de grupos funcionais; no entanto, o sistema de classificação mais útil é baseado na origem biogenética dos metabólitos, dividindo-os em três grupos principais: fenólicos, terpenóides e alcalóides. (LATIF; CHIAPUSIO; WESTON, 2017).

Estima-se que cerca de 100.000 compostos como os: terpenóides, alcalóides, ésteres, ácidos, álcoois, cetonas e aldeídos produzidos pelas plantas, atuam como alomônios, cairomônios, e sinomônios na regulação e controle da interação ecológica planta-inseto (METCALF; KOGAN, 1987).

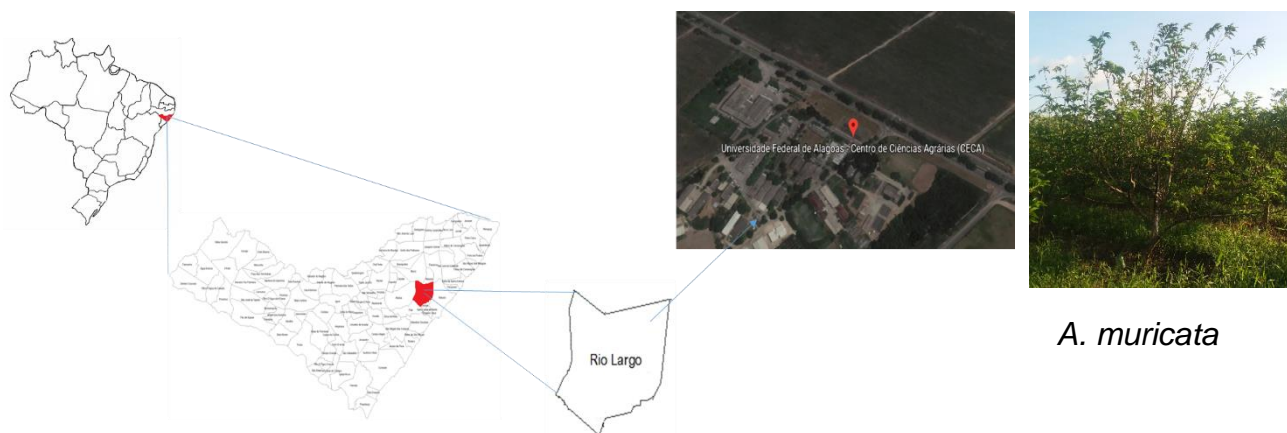
Neste contexto, o presente estudo objetivou verificar a preferência da praga *Cerconota anonella* por diferentes estágios da planta de pinha e graviola, identificar quais compostos químicos voláteis presentes em plantas de *A. squamosa* e *A. muricata* atraem o lepidóptero em questão.

## 6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.2.1 Obtenção das Plantas

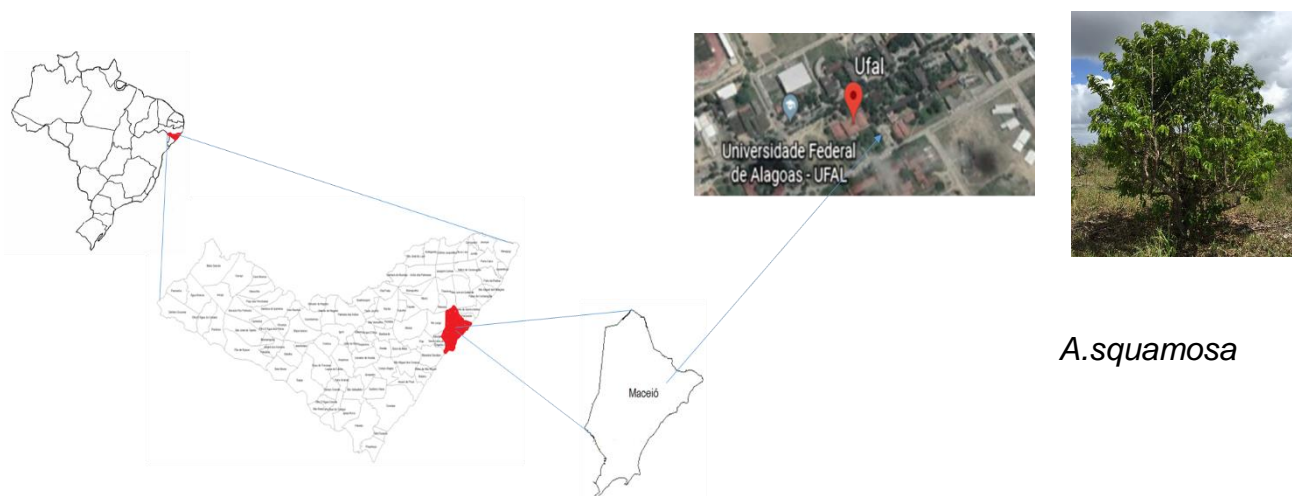
As plantas utilizadas nos experimentos foram: a pinheira (*A. squamosa*), cultivada pelo Laboratório de Biologia vegetal BIOVEG - CECA-UFAL (7°27'57"S; 34°50'1"W) (**Figura 1**) e gravioleira (*A. muricata*) cultivada pelo laboratório de Ecologia Química, da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) (**Figura 2**). As plantas de pinheira e gravioleira foram regadas a cada dois dias até atingirem os estágios utilizados nos experimentos.

**Figura 1-** Localização para obtenção da *A. muricata*.



Fonte: Autor, 2020.

**Figura 2-** Localização para obtenção da *A. squamosa*.



Fonte: Autor, 2020.

### 6.2.2 Obtenção dos Insetos

Frutos brocados (com sinais de ataque da *C. anonella*) de *A. muricata* (graviola) em diferentes estágios de maturação (verde, intermediário e maduro), foram coletados em pomares, localizado em Pindorama- Coruripe. Em seguida, levados ao Laboratório de Ecologia Química- UFAL. Os frutos brocados permaneceram em gaiolas. Os insetos adultos emergidos nesta situação, ficaram em câmaras de acasalamento para postura de ovos. As

lagartas de *C. anonella* removidas dos frutos brocados foram mantidas em placas Petri de acrílico contendo dieta artificial de realimentação, sendo mantidas em laboratório para criação até obtenção da fase de pupa. A dieta era composta dos seguintes ingredientes: gérmen de trigo, cloridrato de colina, sais de Wesson, ácido ascórbico, farelo de soja, açúcar, nipagin, ácido sórbico, ágar-ágar, solução vitamínica, formol, ambrasinto, vita gold e água destilada (SILVA, 2012).

No estágio de pupa, fêmeas e machos foram sexados com o auxílio do microscópio, baseado na presença de poro genital, presente em machos e, ausente em fêmeas. Em seguida, foram colocadas em placas forradas com algodão umedecido com água destilada e uma solução de sulfato de cobre a 1%, cobertas com papel filtro e mantidas em câmara de vidro (9 cm de largura x 16 cm de comprimento x 9,5 cm de altura) devidamente etiquetadas, onde se encontrava um recipiente de vidro contendo solução de mel em água a 10%. Todo este procedimento ocorreu em sala climatizada ( $24,1^{\circ}\text{C} \pm 1,2$  e  $65\% \text{ UR} \pm 1,9$ ), com fotoperíodo invertido (12h:12h).

Após a emergência dos adultos, fêmeas e machos virgens de *C. anonella*, foram colocados em câmaras de vidro (9 cm de largura x 16 cm de comprimento x 9,5 cm de altura) devidamente etiquetadas, onde se encontrava um recipiente de vidro contendo solução de mel em água a 10%. As fêmeas acasaladas foram utilizadas em posteriores bioensaios.

### 6.2.3 Aeração

Para a obtenção dos constituintes voláteis de plantas de *A. muricata* e *A. squamosa* (**Figura 3**) foram realizadas aerações nos três estágios de desenvolvimento (vegetativo, floração e frutificação). Para isso, foram montados sistemas de aeração utilizando sacos plásticos apropriados contendo um filtro do composto carvão ativado (300 mg) adaptado à entrada de um fluxo constante de ar (0,5 L/min) para purificar o ar que entrava no sistema e outro tubo coletor contendo o material adsorvente tenax® (100 mg; Chromopack 60-80 mesh), acoplado à saída que servia para adsorver as substâncias voláteis liberadas pela planta. Ao sistema estava conectada uma bomba de ar, fazendo com que uma corrente de ar filtrado com carvão ativado passa no interior da

câmara e posteriormente em um filtro contendo o adsorvente (Tenax®). A aeração foi processada por um período de 24 horas.

**Figura 3-** Sistema de aeração.



Fonte: Autor, 2020.

#### **6.2.4 Dessorção dos compostos voláteis de *A. squamosa* e *A. muricata***

Os constituintes voláteis da planta de *A. squamosae* e *A. muricata*, foram dessorvidos do adsorvente, tenax, pela passagem de 1 mL de hexano bidestilado com elevado grau de pureza (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>). Dessa forma, foram obtidos extratos de pinha extraídos com o hexano. Os extratos foram guardados em ampolas de 2 mL. Em seguida, as ampolas foram fechadas, etiquetadas e conservadas em refrigerador, para uso posterior em bioensaios.

#### **6.2.5 Identificação dos constituintes voláteis por CGxEM**

Os constituintes químicos presentes nos extratos das plantas de pinha e graviola foram identificados por meio de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) da Agilent Technologies (7890ATM CG, Serie 5975C EM; Palo Alto, CA, USA) equipado com uma coluna capilar DB-5 da Agilent J&W (30 m × 0,25 mm d.i. × 0,25 µm de espessura do filme) (**Figura 4**).

Uma alíquota de 1  $\mu\text{L}$  de cada amostra do extrato contendo os constituintes liberados pelas plantas foi introduzida no injetor do cromatógrafo do CG-EM, sob o modo splitless, a uma temperatura de 150°C. A temperatura do forno foi mantida inicialmente a 40°C durante 2 min e, em seguida, aumentada para 230°C a uma velocidade de aquecimento de 4°C/min e mantida a 230°C por 5 min. O fluxo de gás de arraste (hélio) foi mantido a 1 mL/min a uma pressão constante de 7.0 psi. A temperatura da interface do EM e do quadrupolo foram ajustadas para 230°C e 150°C, respectivamente. Os espectros de massas foram obtidos a 70 eV, registrados no intervalo de m/z 30-350 a uma velocidade de escaneamento de 0.5 scan/s.

Os componentes foram identificados por comparação de seus espectros de massas e índices de retenção, obtidos pela coinjeção da amostra com uma série de n-alcenos (C7-C40) e calculados através da equação de Van Den Dool e Dec Kratz (1963; MÜHLEN, 2009), com padrões autênticos armazenados nas bibliotecas de referência NIST08, Adams (2007) e Wiley Registry™ (versão 9), integradas ao software Agilent MSD Productivity ChemStation Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EUA).

**Figura 4-** Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas.



Fonte: Autor, 2019.

#### **6.2.6 Cromatografia Gasosa acoplada à Eletroantenografia (CG/EAD):**

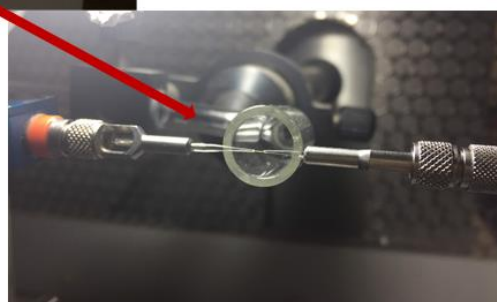
A fim de identificar quais constituintes químicos presentes nos extratos de aeração plantas apresentam atividade biológica diante de antenas de

fêmeas acasaladas, as análises eletrofisiológicas foram conduzidas empregando-se um cromatógrafo gasoso (Trace GC Ultra; Thermo Scientific, Milão, Itália), equipado com uma coluna DB-5 (30m x 0,25mm i.d. x 0,25µm film, ValcoBond) e um detector de ionização em chamas (FID) acoplado a uma interface de detecção eletroantenográfica provida pela Syntech (Kirchzarten, Alemanha) (GC-EAG).

Uma alíquota das amostras (1,0 µL) foi injetada em cromatógrafo gasoso. Foram utilizadas fêmeas acasaladas com idade variando de 3 a 5 dias. A antena do inseto foi extraída com o auxílio de micro-tesoura, a base e a ponta da antena foram colocadas entre dois eletrodos capilares de vidro, preenchidos com solução de Ringer (8.0 g/L de NaCl, 0,4 g/L de KCl, 0,4 g/L de CaCl<sub>2</sub>) ligado a fios de prata (**Figura 5**).

A análise ocorreu sob o modo *splitless* a uma temperatura de 150 °C. O forno do equipamento foi programado para operar a uma temperatura inicial de 40 °C, com velocidade de aquecimento de 6 °C/min até atingir a temperatura final de 200 °C. Durante o processo, o fluxo de gás de arraste, contendo os constituintes químicos separados na coluna, foi dividido em duas partes iguais: uma seguiu para a antena do inseto (detector antenográfico) e a outra para o FID, ocorrendo o registro simultâneo das respostas de ambos os detectores ao material eluído da coluna. Um composto foi considerado EAG-ativo quando induziu despolarização na antena em, pelo menos, três dos seis indivíduos testados.

**Figura 5-** Cromatógrafo gasoso acoplado a eletroantenógrafo



Fonte: Autor, 2019.

### 6.2.7 Obtenção das soluções e formulações dos compostos sintéticos

Os padrões dos compostos sintéticos ( $\beta$ -mirceno,  $\beta$ -ocimeno, benzoato de metila e linalol) foram adquiridos comercialmente da *Sigma-Aldrich* (Brasil) com grau de pureza  $\geq 98,5\%$ . Posteriormente, para o preparo das soluções dos compostos foram utilizados os seguintes procedimentos: 5  $\mu\text{L}$  do composto sintético foram transferidos para um balão volumétrico de 5,0 mL completando-se o volume com hexano bidestilado grau (HPLC) e homogeneizando a solução, obtendo-se assim, uma solução com concentração 1,0  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Para a solução com concentração de 10,0  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{L}$  do composto sintético foram transferidos para um balão volumétrico de 5,0 mL completando-se o volume com hexano bidestilado grau (HPLC) e homogeneizando a solução. As soluções dos compostos foram acondicionadas em *vials* de vidro, os quais foram mantidos em freezer para posterior uso nos bioensaios comportamentais.

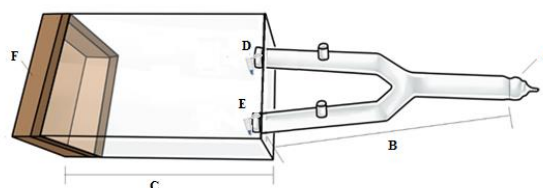
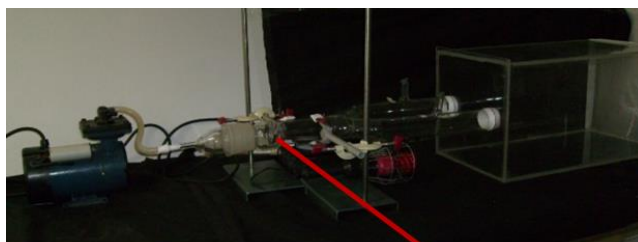
Volumes de 10  $\mu\text{L}$  de cada solução dos compostos individuais/mistura nas concentrações de 1,0 e 10,0  $\mu\text{L}/\text{mL}$  foram formulados em *ependorfs* contendo 0,01 g de um substrato biopolimérico através da adsorção por contato durante um período de 24h.

### 6.2.8 Bioensaios de atratividade

A atividade biológica dos extratos de aeração de plantas de *A. squamosa* (vegetativo, florado e frutificado), frente a fêmeas acasaladas de *C. anonella* foram avaliadas em ofatômetro com Tubo bifurcado acoplado a ampla área de monitoramento retangular (**Figura 6**), que é formado por um conjunto geral composto: de uma tampa (**A**) (comprimento 19,5 cm x largura 13,2) para entrada de ar; um tubo bifurcado tipo Y (**B**) (54,2 cm de comprimento x 23 cm de largura) composto por dois braços, onde cada braço apresenta uma entrada para amostra (**D e E**) (diâmetro de 14 cm). Acoplado a esse tubo bifurcado há uma área de monitoramento retangular- arena (**C**), confeccionada em acrílico transparente (comprimento 19,5 cm x largura 13,2), apresentando de um lado duas saídas circulares que servem como conexão para as bifurcações do tubo e do outro lado uma entrada provida de uma tampa (**F**) em material de malha e elastano, destinada a inserção dos insetos.



**Figura 6-** Esquema do sistema de bioensaio, com olfatômetro Tubo bifurcado acoplado a ampla área de monitoramento retangular.



Nota: Esquema do olfatômetro: **A**: tampa para entrada de ar; **B**: um tubo bifurcado - tipo Y; **C**: área de monitoramento retangular- arena; **D e E**: entradas para amostras e **F**: Tampa da arena.

Fonte: Autor, 2020

O inseto é colocado no início da área de monitoramento/arena através da tampa, em seguida a mesma é fechada para evitar a saída dele. Depois de inserido na área de monitoramento, o inseto inicia a exibição de comportamentos específicos, apresentando ou não voo direcionado em direção a fonte de estímulos.

Os bioensaios foram realizados no laboratório ( $24,8^{\circ}\text{C} \pm 1,4^{\circ}\text{C}$ ), durante a escotofase, das 8h às 12h. foram utilizadas fêmeas acasaladas de *C. anonella* acasaladas (3 – 5 dias de idade). Os bioensaios foram conduzidos com o auxílio de uma luz vermelha pois simulava a noite para o inseto e facilitava a visualização do comportamento do mesmo. Uma fêmea (acasalada), foi introduzida na arena, a qual foi usada somente uma única vez e seu padrão de procura foi observado durante 15 minutos.

Para os bioensaios tanto com fêmeas acasaladas padronizaram-se as dosagens utilizando-se  $10\ \mu\text{L}$  de cada extrato, que foram aplicados em *ependorf* contendo  $0,01\text{g}$  de biopolímero (quitosana), estes então, foram

colocados em um dos braços do sistema do “Y”, e eram substituídos a cada bioensaio. O extrato foi considerado preferencial, quando este atraísse os insetos ou provocasse algum comportamento (antenação, voo curto e/ou voo longo orientado) em direção ao mesmo. As posições dos braços do olfatômetro foram alteradas entre os tratamentos para evitar qualquer efeito tendencioso de habituação. O mesmo procedimento foi aplicado para as formulações com os compostos sintéticos (**Tabela 1**).

**Tabela 1-** Formulações de compostos EAD ativos no extrato de planta de pinha no estágio frutificado, nas concentrações de 1 e 10 µL/mL.

M1: $\beta$ -Mirceno, $\beta$ -Ocimeno, benzoato de metila e Linalol
M2: $\beta$ -Mirceno, $\beta$ -Ocimeno e benzoato de metila
M3: $\beta$ -Mirceno, $\beta$ -Ocimeno e Linalol
M4: $\beta$ -Mirceno, benzoato de metila e Linalol
M5: $\beta$ -Ocimeno, benzoato de metila e Linalol

### 6.2.9 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram analisados primeiramente com a finalidade de verificar os pressupostos paramétricos de normalidade e homogeneidade das variâncias dos tratamentos. Uma vez que os parâmetros de normalidade não foram atendidos, o teste não-paramétrico de Wilcoxon ( $P < 0,05$ ) foi aplicado a fim de verificar quais tratamentos influenciaram no comportamento de atratividade para fêmeas acasaladas e machos virgens. Todas as análises estatísticas foram executadas no programa Origin 8.

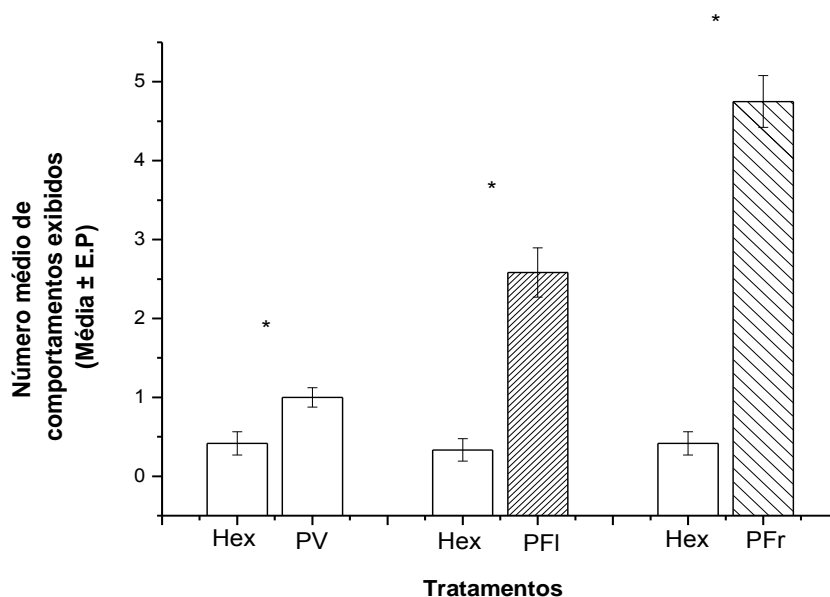
## 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.3.1 Boensaios preferenciais aos estágios de maturação de *A. squamosa*.

Nos bioensaios, foi identificado em fêmeas acasaladas de *C. anonella* os comportamentos de antenação, voo curto e voo longo orientado para a fonte de

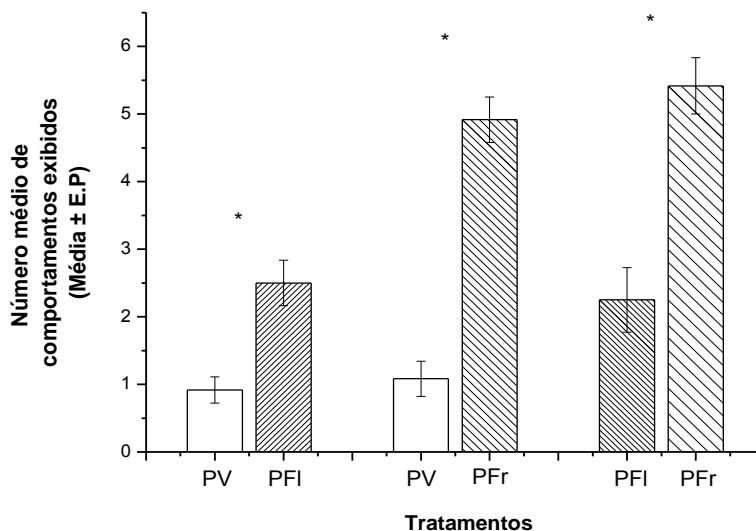
odor e toque e permanência na fonte de odor na presença dos extratos das plantas de pinha nos estágios de maturação vegetativo, florado e frutificado. As mesmas foram mais atraídas para os extratos dos estágios dos extratos florado e frutificado. Comparando tais tratamentos em relação ao controle (hexano) e entre si, foi possível verificar que houve diferença estatística significativa pelo teste de Wilcoxon ( $P < 0.05$ ), constatando que o controle não exerce influência na resposta do inseto (**Figura 7**). Quando comparados os extratos entre si, foi possível observar que houve maior número de respostas para o estágio frutificado, considerado como preferencial na atração da *C. anonella*. Também foi possível observar que as fêmeas são atraídas ainda na fase de floração. Sendo, como ilustra a **Figura 8** representando graficamente os resultados obtidos.

**Figura 7** - Atratividade de fêmeas para extratos de pinheira e hexano



Nota: Hexano (HEX); Planta estágio vegetativo (PV); PFI: Planta Florada (PF) e Planta Frutificada (PFR); \* indica que houve diferença estatística significativa pelo teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ).

**Figura 8** - Atratividade preferencial de fêmeas para extratos de pinheira em diferentes estágio.

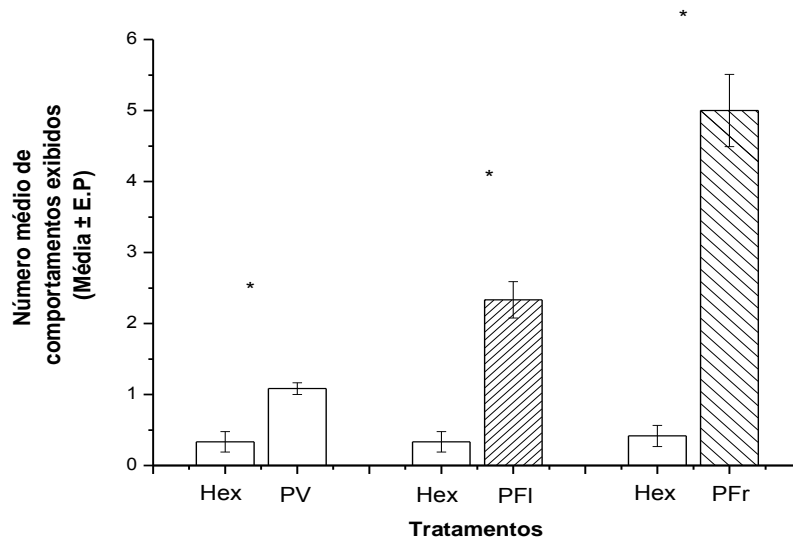


Nota: Planta estágio vegetativo (PV); Planta Florada (PFI); Planta Frutificada (PFr); \* indica que houve diferença estatística significativa pelo teste de wilcoxon ( $p < 0,05$ ).

### 6.3.2 Bioensaios preferenciais aos estágios de maturação de *A. muricata*.

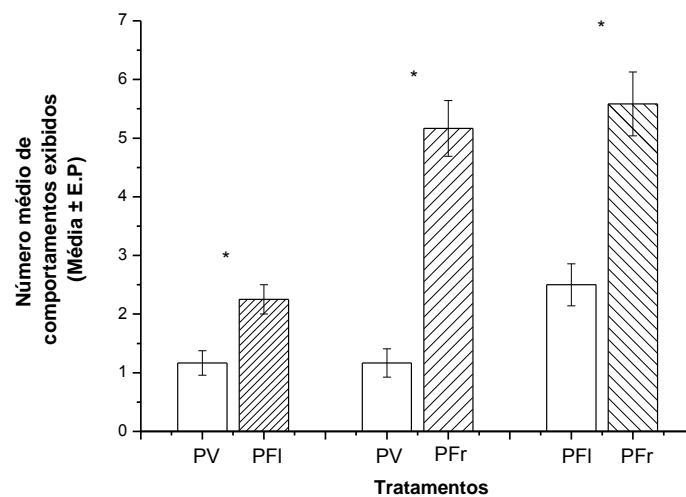
Nos bioensaios, observou-se que as fêmeas acasaladas exibiram o comportamento de antenação, voo curto, voo longo, toque e permanência na fonte de odor frente aos extratos das plantas nos estágio de maturação vegetativo, florado e frutificado. Observou-se ainda que as mesmas realizaram breves caminhadas e voo, buscando a aproximação do extrato. As mesmas responderam a todos os os estágios dos extratos de gravioleira. Comparando os tratamentos testados em relação ao controle (hexano) e entre si, foi possível verificar que houve diferença estatística significativa pelo teste de Wilcoxon ( $P < 0,05$ ), constatando que o controle não exerce influência na resposta do inseto (**Figura 9**). Quando comparados os extratos entre si, constatou-se que as fêmeas foram atraídas ainda na fase de floração, porém, houve maior número de fêmeas atraídas para o estágio frutificado, sendo ele considerado como preferencial na atração de fêmeas de *C. anonella*, como pode ser visto na **Figura 10**.

**Figura 9-** Atratividade de fêmeas de *C. anonella* para extratos de gravioleira e hexano.



Nota: Hexano (HEX); Planta estágio vegetativo (PV); PFI: Planta Florada (PF) e Planta Frutificada (PFr); \* indica que houve diferença estatística significativa pelo teste de wilcoxon ( $p < 0,05$ ).

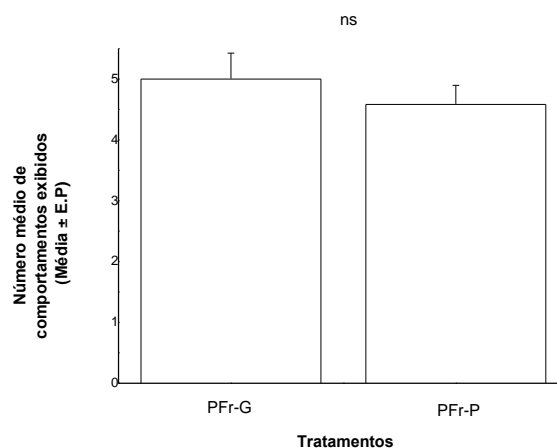
**Figura 10-** Atratividade preferencial de fêmeas de *C. anonella* para extratos de gravioleira em diferentes estágios



Nota: Planta estágio vegetativo (PV); Planta Florada (PFI); Planta Frutificada (PFr); \* indica que houve diferença estatística significativa pelo teste de wilcoxon ( $p < 0,05$ ).

Quando comparados os extratos de pinheira e gravioleira no estágio preferencial frutificado, não houve diferença significativa na atração de fêmeas de *C. anonella* para estes extratos ( $p>0,05$ ) como pode ser visto na **Figura 11**.

**Figura 11-** Atratividade preferencial de fêmeas para extratos de pinheira e gravioleira.



Nota: Planta Frutificada Graviola (PFr-G); Planta Frutificada Pinha (PFr-P); ns indica que não houve diferença estatística significativa pelo teste de Wilcoxon ( $p<0,05$ ).

A depender da qualificação e quantificação das composições químicas das misturas de voláteis emitidos pelas plantas podem traduzir o status fisiológico em que elas se encontram ou até mesmo o estresse a que elas estão sendo submetidas (RIFFEL; DA COSTA, 2015).

As plantas, antes mesmo da descoberta dos pesticidas, já eram mundialmente utilizadas no controle de pragas. Atualmente vários produtos à base de plantas ainda são utilizados com a finalidade de minimizar os possíveis danos ocasionados por insetos-pragas (ADEYEMI *et al.*, 2010; STEVENSON; BELMAIN, 2016).

As respostas olfatórias de lepidópteros para odores de plantas são conhecidas por serem muito importantes na localização do hospedeiro. A percepção dos sinais químicos é determinante na adequação da planta para a oviposição. A idade e estágio do hospedeiro devem ser suficientes para que a mesma possa desenvolver-se e completar seu ciclo biológico (BLACKMER *et al.*, 2001). Os resultados dos bioensaios realizados neste trabalho servem para justificar a preferência da praga para o estágio da planta frutificado, garantindo

assim, que as lagartas de *C. anonella* provenientes da oviposição na superfície do fruto tenham alimento para o seu bom desenvolvimento.

Em lepidópteros existe seletividade maior da fêmea na escolha do hospedeiro, isso ocorre por existir um código químico mais específico que a direciona ao substrato adequado (REHWICK; CHEW, 1994). Em *C. anonella* a premissa reside no fato de que as fêmeas necessitam de locais adequados para oviposição, corte e acasalamento.

A maioria dos estudos de preferência e especificidade de oviposição em insetos têm usado experimentos de escolha simultânea. Deste modo, uma mudança de hospedeiro ou estágio do mesmo envolve uma alteração na hierarquia de preferência pelo mesmo (THOMPSON; PELLMYR, 1990). No caso de mariposas, as evidências sugerem que misturas de compostos voláteis são requeridas para que haja o estímulo no comportamento de busca (REHWICK; CHEW, 1994).

A liberação do feromônio sexual em algumas espécies de mariposas podem ser influenciadas pelos COV's do hospedeiro. Em fêmeas de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), praga do milho, a presença da planta hospedeira induz a produção de feromônio sexual (RAINA *et al.*, 1992).

Estudos conduzidos para fêmeas de *Cydia molesta* (Lep: Tortricidae), as quais ovipositam em pêsegos e maçãs, mostraram que as mesmas foram atraídas para COVs de ambos os frutos hospedeiros, sem discriminação. Os autores sugerem que, do ponto de vista comportamental, o significado dos estímulos olfativos é assumido como reflexo do seu nível de especialização em relação ao hospedeiro; assim, para espécies polípagas, esta modalidade sensorial é considerada secundária (NATALE *et al.*, 2003). O mesmo parece ser válido para *C. anonella*, fato este comprovado pela sua atratividade para os extratos de pinha e graviola, porém, sem exibição de preferência.

### **6.3.3 Composição química dos extratos de plantas em diferentes estágios preferenciais de *A. squamosa* e *A. muricata*.**

As análises qualitativas dos extratos obtidos por aeração de plantas de pinheira nos estágios florada e frutificada, dessorvidos em hexano, apresentou uma grande similaridade na composição química (**Tabela 2**).

**Tabela 2-** Identificação dos compostos em extratos de *A. squamosa*.

	Planta Florada	Planta Frutificada
1	Acetato de butila	Acetato de butila
2	2-metil-2- ciclopenten-1-ona	2-metil-2- ciclopenten-1-ona
3	2,5-Hexanediona	$\alpha$ -pineno
4	Benzaldeído	Benzaldeído
5	3-metil-2- ciclopenten-1-ona	3-metil-2- ciclopenten-1-ona
6	$\beta$ -mirceno	6-metil-5- hepten-1-ona
7	Octanal	$\beta$ - mirceno
8	Limoneno	Hexanoato de etila
9	$\beta$ - ocimeno	Limoneno
10	Benzoato de metila	Álcool benzílico
11	Linalol	(Z)- $\beta$ -ocimeno
12	Nonanal	(E)- $\beta$ -ocimeno
13	2-fenil-etanol	$\gamma$ -octalactona
14	(E)-4,8-Dimetil-1,3,7-nonatrieno	Octanol
15	Benzoato de etila	Benzoato de metila
16	Salicilato de metila	Linalol
17	Decanal	Nonanal
18	Acetato de 2-feniletilo	2-fenil-etanol
19	Salicilato de etila	Octanoato de metila
20	Indol	Benzoato de etila
21	Undecanal	Salicilato de metila
22	$\delta$ -Elemeno	$\gamma$ -cadineno
23	Butanoato de butila	Verbenona
24	$\beta$ - elemeno	Carvona
25	(E)-2-Undecen-1-ol	Salicilato de etila
26	$\beta$ -cariofileno	Isobutil benzoato
27	Geranil acetona	$\delta$ -Elemeno
28	$\alpha$ -humuleno	$\alpha$ -Copaeno
29	$\beta$ -cubeno	$\beta$ -Elemeno
30	Biciclogermacreno	Cariofileno
31	$\gamma$ -cadineno	$\beta$ -Copaeno
32	Geranil linalol	$\gamma$ -muroleno
33	(Z)- $\alpha$ -damascone	3-metil-1-butanol benzoato
34	Salicilato de 2-etil-hexilo	Geranil acetona
35		(E)- $\beta$ -farneseno
36		Germacreno D
37		$\alpha$ -Bergamoteno
38		biciclogermacreno
39		$\alpha$ -Farneseno
40		Geranil linalol
41		(Z)- $\alpha$ -damascona

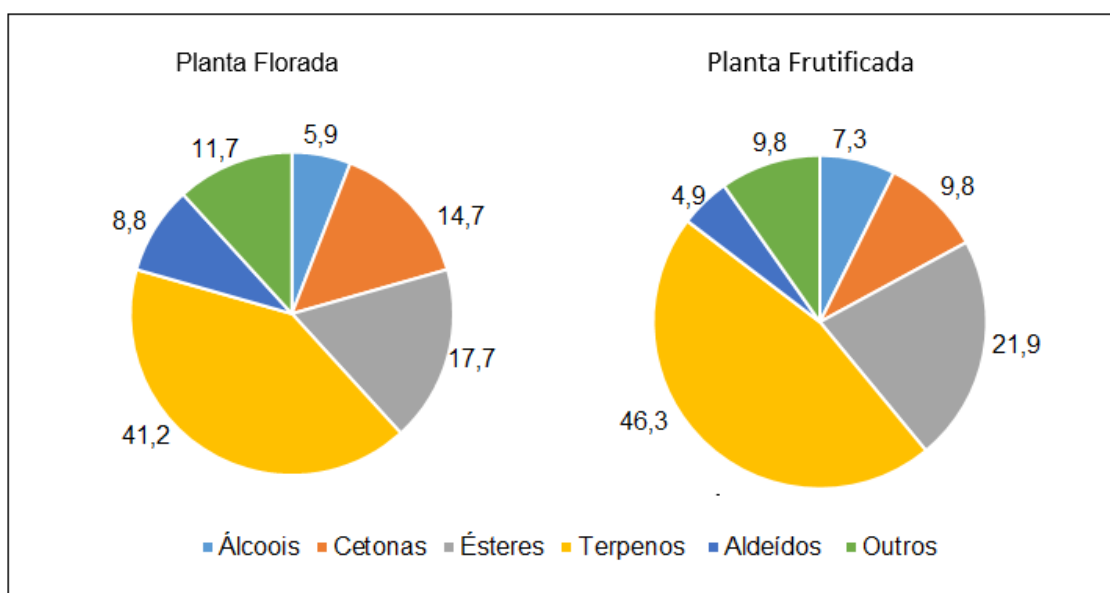


Esses resultados também foram observados com as gravioleiras, porém com menor grau de similaridade entre os compostos (**Tabela 3**).

Plantas de *A. squamosa* no estágio florada apresentam 34 compostos voláteis, já no estágio frutificado apresentaram 41 compostos, sendo 18 destes comuns a dois estágios.

De maneira geral, a composição química dos compostos orgânicos liberados por plantas de *A. squamosa* é constituída álcoois, cetonas, ésteres, aldeídos, terpenos e outros. Sendo a classe dos terpenos como majoritária, para os estágios fenológicos florado e frutificado, respectivamente, com 41,2% e 46,3% (**Figura 12**).

**Figura 12-** Principais classes químicas de compostos encontradas nos extratos de plantas de *A. squamosa*.



Os extratos analisados de *A. muricata* no estágio florado apresentaram uma maior variedade de constituintes químicos quando comparado ao estágio frutificado. Compostos comuns a ambos os estágios também foram encontrados na composição química dos extratos de planta frutificada, como podem ser observados na **Tabela 3**.

Plantas de *A. muricata* no estágio florada apresentam 19 compostos voláteis, já no estágio frutificado apresentaram 15 compostos, sendo 5 destes comuns a dois estágios.

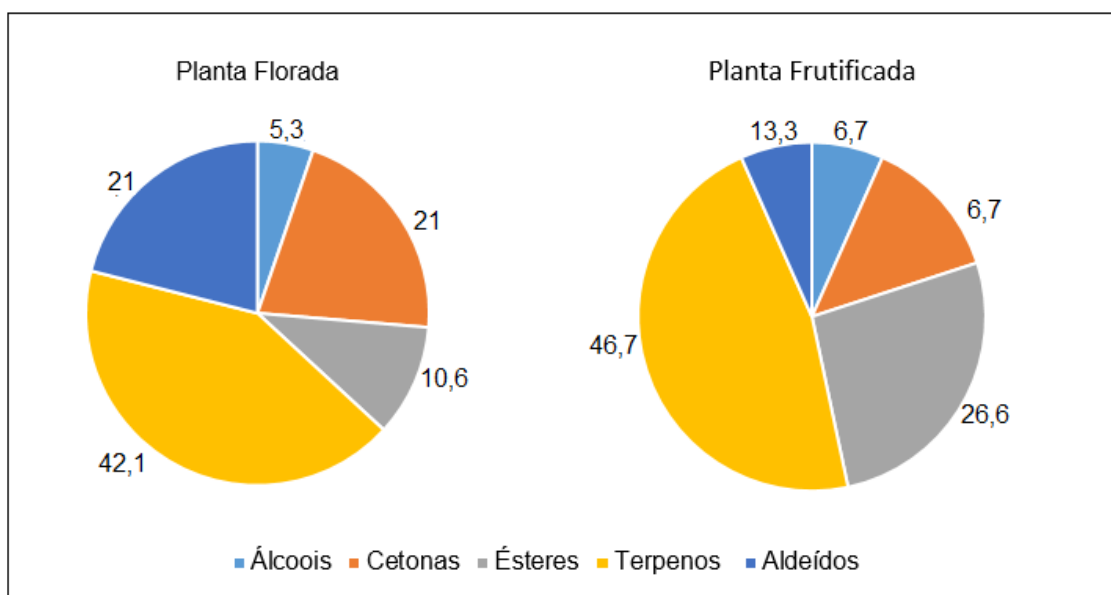
De maneira geral, a composição química dos compostos orgânicos liberados por plantas de *A. muricata* é constituída álcoois, cetonas, ésteres, aldeídos, terpenos e outros. Sendo a classe dos terpenos como majoritária, para os estágios fenológicos florado e frutificado, respectivamente, com 41,2% e 46,7% (**Figura 13**).

Uma grande variedade de compostos alifáticos e aromáticos voláteis é encontrada em plantas, contendo álcool, aldeído, cetona, grupos funcionais de ácido ou éster. Esses compostos estão geralmente presentes em concentrações mais baixas nas plantas (JOBICHEN; SELVANARAYANAN, 2019).

**Tabela 3-** Identificação dos compostos em extratos de *A. muricata*.

	Planta Florada	Planta Frutificada
1	3-hexen-1-ol	$\beta$ -farneseno
2	2-metil-2-ciclopentanona	(E)-4,8-Dimetil-1,3,7-nonatrieno
3	Benzaldeído	(E)- $\beta$ -ocimeno
4	3-Metil-2-ciclopentanona	1-hexanol
5	$\alpha$ -pineno	2-Nonanona
6	(E)- $\beta$ -ocimeno	Acetado de butila
7	Acetofenona	Cariofileno
8	(E) -4,8-Dimetil-1,3,7-nonatrieno	Sabineno
9	Linalol	Hexadecanoato de etila
10	Nonanal	Geranil acetona
11	Salicilato de metila	Hexanoato de metila
12	Decanal	Linalol
13	Isoterpinoleno	Octanoato de metila
14	Germacreno D	Nonanal
15	Butanoato de butila	$\gamma$ -terpineno
16	$\beta$ -elemeno	
17	Dodecanal	
18	Cariofileno	
19	Geranil acetona	

**Figura 13-** Principais classes químicas de compostos encontradas nos extratos de plantas de *A. muricata*.



Os resultados obtidos com Silva (1999) corroboram para os estudos químicos realizados, destacando na identificação do estágio frutificado a presença da classe dos terpenos como majoritária.

Os terpenóides são de grande importância na ecologia química, na atração de polinizadores, na defesa das plantas e na interação com o meio ambiente. Constituem a maior classe de voláteis de plantas representados principalmente por isopreno, monoterpenos e sesquiterpenos. (NAGEGOWDA, 2010).

Idstein e colaboradores (1984) em seu estudo dos compostos voláteis de *Annona cherimóia*, identificaram 208 compostos voláteis, incluindo qualitativamente hidrocarbonetos, ésteres, álcoois, carbonilas e voláteis de diversas estruturas. Quantitativamente, álcoois, uma série de butanoatos e ésteres constituíram a maior parte dos voláteis.

Cheong *et al.* (2010) na análise por headspace dos compostos voláteis liberados pela graviola (*A. muricata* L.) identificaram um total de 35 compostos voláteis, compreendendo dezenove ésteres, seis álcoois, três terpenos, dois ácidos, dois aromáticos, duas cetonas e um aldeído.

Ekundayo (2011) em seu trabalho de revisão sobre os constituintes voláteis das *anonáceas*, identificou mais de duzentos compostos voláteis em óleos essenciais presentes em diversas espécies de *anonáceas*. Estes compostos são basicamente mono e sesquiterpenos, destacando:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno,  $\beta$ -ocimeno, limoneno, linalol e 1,8-cineol.

Fêmeas de Lepidoptera da espécie *Synanthedon scitula*, são atraídas para COVs emitidos por maçãs e os mesmos também continham em sua composição compostos pertencentes a classe dos terpenóides, como por exemplo, o  $\alpha$ -bergamoteno (FRANK *et al.*, 2011).

Análises de voláteis emitidos por frutos de pêssego, hospedeiro de *C. molesta*, revelaram a presença de 22 compostos, incluindo ácidos, aldeídos, ésteres e terpenóides, tais como 3-careno, *cis*- $\beta$ -ocimeno, *trans*-cariofileno e  $\alpha$ - e  $\beta$ -farneseno (NATALE *et al.*, 2003), também encontrados no presente estudo.

Em seu estudo Mookherjee *et al.* (1990) mostraram que a composição e a quantidade de odores emitidos por flores quando colhidas eram significativamente diferente daqueles quando as flores estavam na planta. Esta observação corroborou para a adequação da metodologia a ser empregada nesse estudo.

O monoterpeneo (*E*)-4-8-dimetil-1,3,7-nonatrino é emitido por muitas plantas como uma resposta ao ataque de herbívoros. Também foi descrito como sendo um atrativo para diversas espécies de insetos, entre os quais machos e fêmeas da mariposa da maçã *Cydia pomonella* (KNIGHT; LIGHT; TRIMBLE, 2011). Já foi identificado também em amostras obtidas a partir da coleta de voláteis de cachos de uva (TASIN *et al.*, 2006).

Para a mariposa praga mundial da groselha preta, *Synanthedon tipuliformis*, em respostas de Eletroantenografia, aos compostos produzidos por cardos do Canadá, *Cirsium arvense* (L.), as antenas responderam aos compostos fenil acetadeído, salicilato de metila e salicilato de dimetila. O autor indica que essa mistura de cairomônios, pode ser usada com o feromônio sexual para fornecer uma opção de controle eficaz para essa praga (EL-SAYED *et al.*, 2016).

Li *et al.* (2019) em seu estudo com *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) indicou que o nonanal, decanal e outros dois

compostos poderiam estimular as fêmeas acasaladas a depositarem mais ovos. Em um trabalho de teste da resposta da mariposa *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae) aos compostos voláteis liberados por sementes de milho, por meio de EAG e testes comportamentais em túnel de vento. Foram identificados dentre os compostos o nonanal, um outro aldeído, o decanal e a geranil acetona. Os testes em EAG revelaram que todos os compostos identificados desencadearam respostas nas antenas de machos e fêmeas de *S. cerealella* e os testes comportamentais em túnel de vento revelaram que a mistura de voláteis emitida por sementes de milho é atrativa para machos virgens e fêmeas acasaladas de *S. cerealella* (FOAUD *et al.*, 2013).

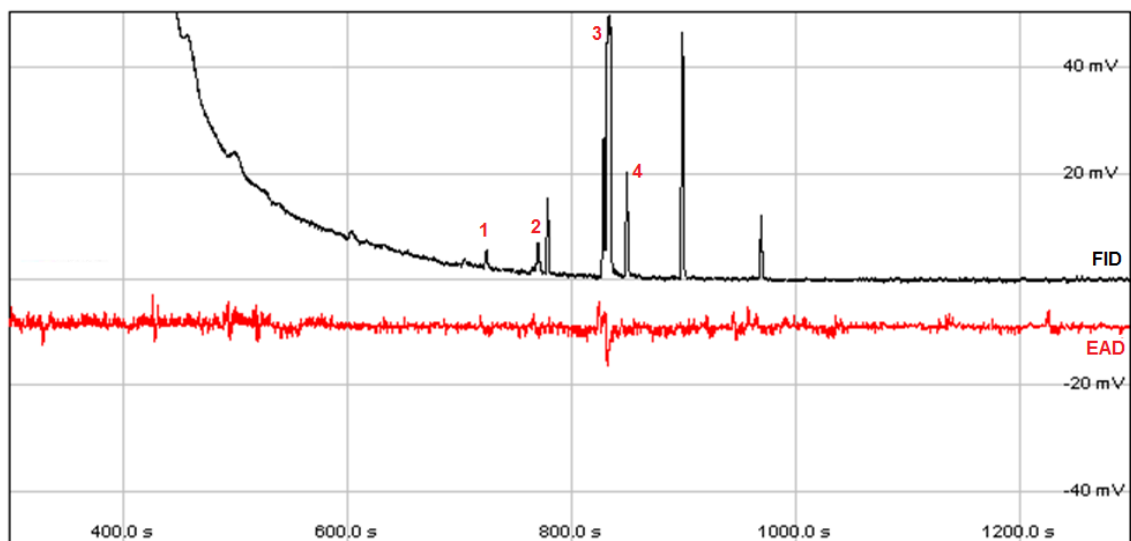
O composto nonanal encontrado em todos os estágios das plantas de *A. muricata* e *A. squamosa* estudadas é um aldeído que quando emitido pela planta pode tanto desencadear atratividade como repelência. Experimentos realizados utilizando a técnica de EAG para verificar a resposta da mariposa *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) aos compostos liberados por *Opuntia stricta* (Cactaceae) perceberam que dentre os compostos identificados, o nonanal desencadeou a segunda maior resposta nas antenas dos machos (POPHOF; STANGE; ABRELL 2005).

As plantas liberam um grande número de compostos voláteis e a utilização do EAG, serve para selecionar os compostos candidatos para testes comportamentais, pois o rastreamento desses voláteis baseia-se na atividade antenal.

#### **6.3.4 Identificação dos compostos EAD`s ativos dos extratos de plantas em diferentes estágios preferenciais de *A. squamosa* e *A. muricata*.**

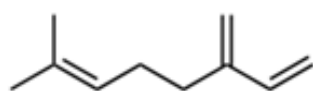
Nas respostas obtidas nas análises por CG-EAD foram identificados compostos bioativos o  $\beta$ -Mirceno,  $\beta$ -ocimeno, benzoato de metila e o Linalol para *A. squamosa* em estágio frutificado (**Figura 14**).

**Figura 14-** Análise de CG/EAD dos extratos de *A. squamosa* no estágio frutificado.

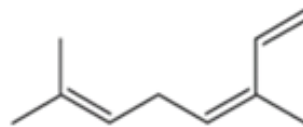


Nota: 1- $\beta$ -Mirceno, 2-  $\beta$ -Ocimeno, 3- benzoato de metila e 4- Linalol.

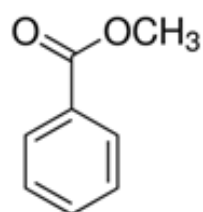
**Figura 15-** Estruturas dos compostos identificados como EADs ativos.



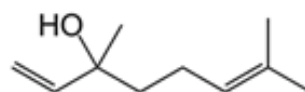
$\beta$ -Mirceno



$\beta$ -Ocimeno



Benzoato de metila

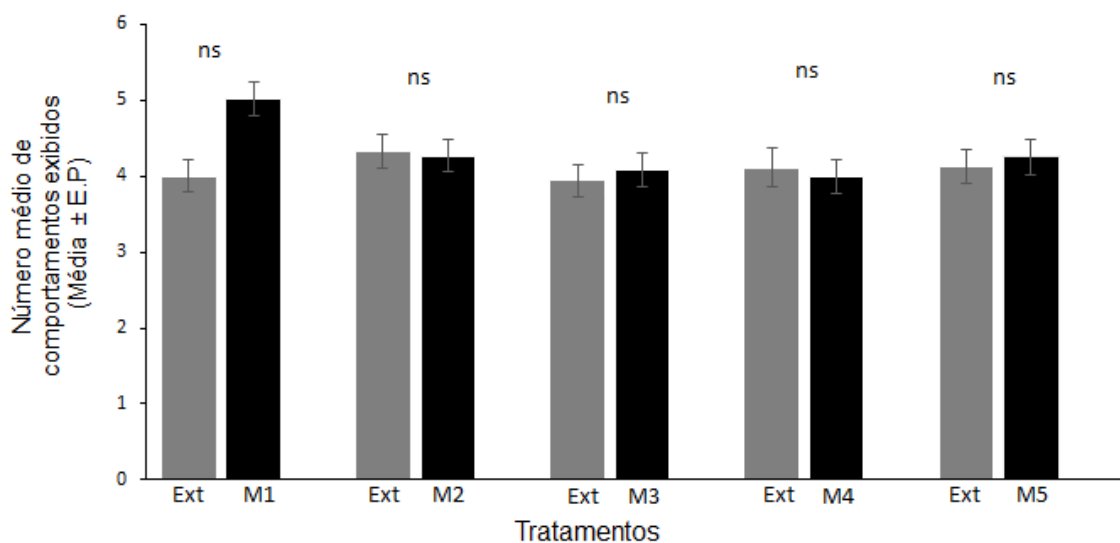


Linalol

### 6.3.5 Atratividade de fêmeas acasaladas de *C. anonella* para as misturas dos compostos EAG-ativos.

Os ensaios comportamentais permitiram avaliar a preferência pela fonte de odor das fêmeas acasaladas de *C. anonella*. Os tratamentos foram testados frente ao extrato da planta de pinha no estágio frutificado. Para os tratamentos na concentração de 1 $\mu$ L/mL não houve diferença significativa das respostas quando comparadas ao extrato da planta de pinha no estágio frutificado pelo wilcoxon ( $p < 0,05$ ) (**Figura 16**).

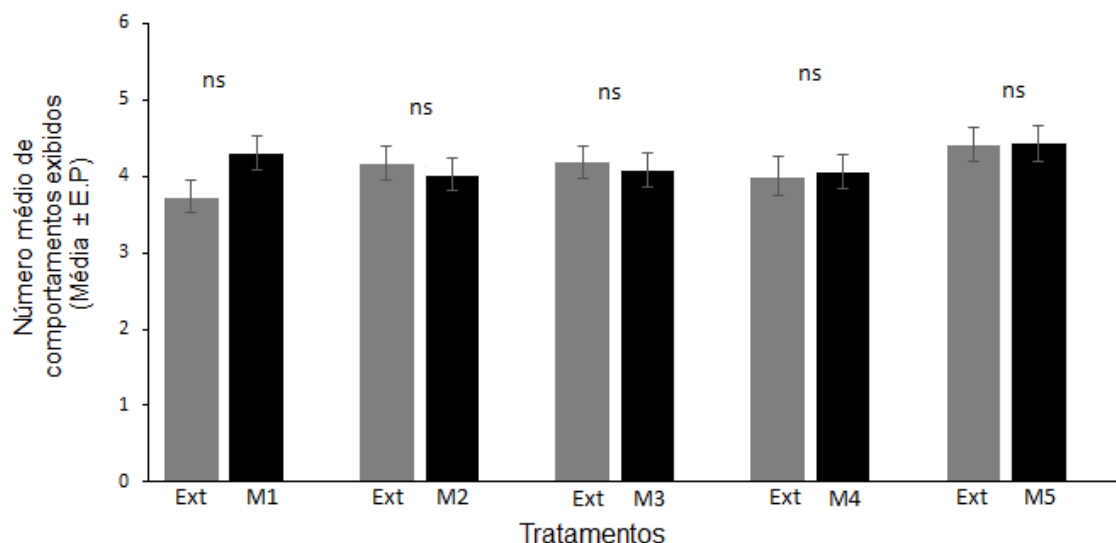
**Figura 16** - Atratividade de fêmeas acasaladas de *C. anonella* para as misturas (Concentração: 1 $\mu$ L/mL) frente ao extrato da planta de pinha no estágio frutificado.



Nota: Misturas (M1:  $\beta$ -Mirceno,  $\beta$ -Ocimeno, benzoato de metila e Linalol, M2:  $\beta$ -Mirceno,  $\beta$ -Ocimeno e benzoato de metila, M3:  $\beta$ -Mirceno,  $\beta$ -Ocimeno e linalol, M4:  $\beta$ -Mirceno, benzoato de metila e Linalol e M5:  $\beta$ -Ocimeno, benzoato de metila e Linalol. ns—indica ausência de diferença estatística significativa pelo Teste de wilcoxon ( $p < 0,05$ ).

Para os tratamentos na concentração de 10 $\mu$ L/mL não houve diferença significativa das respostas quando comparadas ao extrato da planta de pinha no estágio frutificado pelo wilcoxon ( $p < 0,05$ ) (**Figura 17**).

**Figura 17** - Atratividade de fêmeas acasaladas de *C. anonella* para as misturas (Concentração: 10 $\mu$ L/mL) frente ao extrato da planta de pinha no estágio frutificado.



Nota: Misturas (M1: $\beta$ -Mirceno,  $\beta$ -Ocimeno, benzoato de metila e Linalol, M2: $\beta$ -Mirceno,  $\beta$ -Ocimeno e benzoato de metila, M3:  $\beta$ -Mirceno,  $\beta$ -Ocimeno e linalol, M4:  $\beta$ -Mirceno, benzoato de metila e Linalol e M5:  $\beta$ -Ocimeno, benzoato de metila e Linalol. ns—indica ausência de diferença estatística significativa pelo Teste de wilcoxon ( $p < 0.05$ ).

A produção de uma mistura altamente complexa de COVs pode ter começado com uma estratégia de defesa de plantas para depois evoluir para também regular as interações planta-inseto (MAFEI, 2010).

A mistura de voláteis emitidas pelas plantas desempenha um papel crucial no reconhecimento do hospedeiro, na sua aceitação ou rejeição e nas respostas comportamentais subsequentes por meio do inseto, respostas diferentes podem ocorrer para uma mistura de compostos em comparação com componentes individuais (BRUCE; PICKETT, 2011).

Compostos voláteis de plantas foram identificados como mediadores na atração de fêmeas de algumas espécies de lepidópteros para plantas hospedeiras, tais como *Cydia pomonella* (KNIGHT; LIGHT; TRIMBLE, 2011), *Synanthedon scitula* (FRANK *et al.*, 2011), *Phthorimaea operculella* (LI *et al.*, 2019), entre outras.

No trabalho descrito por Backman *et al.*, (2001) as respostas antenais das fêmeas da mariposa *Cydia pomonella* aos voláteis de ramos de maçã com frutos verdes foram registrados por eletroantenografia acoplada a



espectrometria de massas, respondendo fortemente aos compostos 4,8-dimetil-1,3 (*E*), 7-nonatrieno, linalol,  $\beta$ -cariofileno, (*E*)- $\beta$ -farneseno, germacreno D, (*Z*, *E*) - $\alpha$ -farneseno, (*E*, *E*) - $\alpha$ -farneseno, germareno D e salicilato de metila (BACKMAN *et al.*, 2001).

ANDERSEN e colaboradores (1987) em seu trabalho com a mariposa broca de pessegueiro (*Synanthedon pictipes*) identificaram, por GC-MS voláteis de dois cultivares de pêssigo, revelando uma mistura complexa composta de álcoois, ésteres, cetonas, ácidos aromáticos, fenóis, aldeídos alifáticos e ácidos alifáticos. Nas respostas do EAG utilizando as antenas das fêmeas, os compostos que se mostraram mais ativos foram o guaiacol, o benzoato de metila e a 1-fenil-1,2 propanediona. No presente estudo de atratividade de fêmeas de *C. anonella* a voláteis de *Annona*, as análises por CG-EAG revelaram quatro compostos como sendo bioativos, dentre eles o benzoato de metila.

Na investigação da atração de fêmeas de lepidóptera *C. nigricana* para voláteis de flor de ervilha em um túnel de vento e em campo, foram identificados 27 voláteis de plantas de ervilha. Uma mistura de quatro compostos compreendendo hexan-1-ol, (*E*) -2-hexen-1-ol, (*Z*) - $\beta$ -ocimeno e (*E*)- $\beta$ -ocimeno foi atrativa para as fêmeas de *C. nigricana*. Os autores sugerem que os dois isômeros de  $\beta$ -ocimeno são fundamentais para a localização do hospedeiro pela mariposa, e tendo importância secundária, o hexan-1-ol e (*E*)-2-hexen-1-ol (THOMING; KNUDSEN, 2014). A localização do hospedeiro é de fundamental importância para fêmeas de *C. anonella*, pois elas são atraídas primeiramente para suas plantas hospedeiras, e então liberam o feromônio sexual.

#### 6.4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no estudo, conclui-se que a emissão dos COVs das plantas, são moléculas de sinalização muito potentes que evoluíram para atender a múltiplas funções.

A *C. anonella*, é atraída preferencialmente para extratos de *A. squamosa* e *A muricata* no estágio frutificado, não havendo estatisticamente preferência entre eles.

Compostos voláteis emitidos por plantas de pinha e graviola demonstraram um perfil químico semelhante em termos qualitativos para os diferentes estágios fenotípicos.

Nas respostas obtidas nas análises por CG-EAD foram identificados os compostos bioativos  $\beta$ -mirceno,  $\beta$ -ocimeno, benzoato de metila e o Linalol para *A. squamosa* em estágio frutificado.

A mistura 1 (na concentração de 1 $\mu$ L/mL), composta por  $\beta$ -mirceno,  $\beta$ -ocimeno, benzoato de metila e linalol, foi responsável por uma maior atratividade de fêmeas de *C. anonella*.

## 6.5 REFERÊNCIAS

ADEYEMI, M. M. H. A review of secondary metabolites from plant materials for postharvest storage. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, v.6, p. 94-102, 2010.

ANDERSEN, J. F.; MIKOLAJCZAK, K. L.; REED, D. K. Analysis of peach bark volatiles and their electroantennogram activity with lesser peachtree borer, *Synanthedon pictipes* (Grote and Robinson). *Journal of chemical ecology*, v. 13, n. 11, p. 2103-2114, 1987.

BERGSTRÖM, L. G. W. Chemical communication by behaviour-guiding olfactory signals. *Chemical Communications*, n. 34, p. 3959-3979, 2008.

BLACKMER, J. L. *et al.* **Oviposition Preference of *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) and Rates of Parasitism by *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) on *Lycopersicon esculentum* in São José de Ubá, RJ, Brazil, 2001).** *Neotropical Entomology*, 30(1): 89-95, 2001.

BLANDE, J. D. Chapter Eleven-Plant Communication With Herbivores. *Advances in Botanical Research*, v. 82, p. 281-304, 2017.

BRUCE, T. J. A; PICKETT, J. A. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects—finding the right mix. *Phytochemistry*, v. 72, n. 13, p. 1605-1611, 2011.

CHEONG, K. W. *et al.* Equilibrium headspace analysis of volatile flavor compounds extracted from soursop (*Annona muricata*) using solid-phase microextraction. *Food Research International*, v. 43, n. 5, p. 1267-1276, 2010.

DICKE, M.; BALDWIN, I. T. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends in plant science*, 15(3), p.167-175, 2010.

EKUNDAYO, O. A review of the volatiles of the Annonaceae. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, n. 5, p. 223-245, 2011.

EL-SAYED, Ashraf M. *et al.* Identification of a floral-derived kairomone for currant clearwing, *Synanthedon tipuliformis*. **Chemoecology**, v. 26, n. 5, p. 187-193, 2016.

FOUAD, H. A. *et al.* Flight responses of *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae) to corn kernel volatiles in a wind tunnel. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 7, n. 6, p. 651-658, 2013.

FRANK, D. *et al.* **Electrophysiological response of felame Dogwood Borer (Lepidoptera: Sesiidae) to apple volatile compounds.** *Journal of entomological science*.v.44, p. 204-215, 2001.

HARE, J. D. Ontogeny and season constrain the production of herbivore-inducible plant volatiles in the field. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, 2010.

IDSTEIN, H., HERRES, W., SCHREIER, P. High-resolution gas chromatography-mass spectrometry and -Fourier transform infrared analysis of cherimoya (*Annona cherimolia*, Mill.) volatiles. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.32, p.383–389, 1984.

JOBICHEN, C.; SELVANARAYANAN, V. Role of Plant Volatiles, Pest-Resistant Varieties and Transgenics in Tri-trophic Interactions. In: **Experimental Techniques in Host-Plant Resistance**. Springer, Singapore, 2019. p. 245-252.

KESSLER, A. The information landscape of plant constitutive and induced secondary metabolite production. **Current Opinion in Insect Science**. v. 8, 2015.

KNIGHT, A. L.; LIGHT, D. M.; TRIMBLE, R. M. Identifying (E)-4, 8-dimethyl-1, 3, 7-nonatriene plus acetic acid as a new lure for male and female codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). **Environmental entomology**, v. 40, n. 2, p. 420-430, 2011.

LATIF, S.; CHIAPUSIO, G.; WESTON, L. A. Allelopathy and the role of allelochemicals in plant defence. In: **Advances in botanical research**. Academic Press, p. 19-54, 2017.

LI, X. *et al.* Behavioral responses of potato tuber moth (*Phthorimaea operculella*) to tobacco plant volatiles. 2019.

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

MATILE, P.; ALTENBURGER, Rolf. Rhythms of fragrance emission in flowers. **Planta**, v. 174, n. 2, p. 242-247, 1988.

METCALF, R. L.; KOGAN, M. Plant volatiles as insect attractants. **Critical reviews in plant sciences**, v. 5, n. 3, p. 251-301, 1987.

MOOKHERJEE, B. D.; TRENKLE, R. W.; WILSON, R. A. The chemistry of flowers, fruits and spices: live vs. dead-a new dimension in fragrance research. **Pure and Applied Chemistry**, v. 62, n. 7, p. 1357-1364, 1990.

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

NATALE, D. *et al.* **Response of female *Cydia molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) to plant derived volatiles.** *Journals Cambridge*, 93: 335-342, 2003.

POPHOF, B.; STANGE, G.; ABRELL, L. Volatile organic compounds as signals in a plant-herbivore system: electrophysiological responses in olfactory sensilla of the moth *Cactoblastis cactorum*. **Chemical Senses**, v. 30, n. 1, p. 51-68, 2005.

RAINA, A. K. *et al.* Chemical signals from host plant and sexual behavior in a moth. *Science*, v. 255, p. 592- 594, 1992.

RENWICK, J. A. A.; CHEW F.S. **Oviposition behavior in Lepidoptera.** *Ann. Ver. Entomol.*, 39: 377- 400, 1994.

RIFFEL, A.; DA COSTA, J. G. Os voláteis de plantas e o seu potencial para a agricultura. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Docmentos (INFOTECA-E)**, 2015.

SPATHE, A. *et al.* Plant species-and status-specific odorant blends guide oviposition choice in the moth *Manduca sexta*. **Chemical senses**, v. 38, n. 2, p. 147-159, 2013.

STEVENSON, P. C.; BELMAIN, S. R. Pesticidal Plants in African Agriculture: Local uses and global perspectives. *Outlook on Pest Management*, v. 10, p. 226-229, 2016.

TASIN, M. *et al.* Essential host plant cues in the grapevine moth. **Naturwissenschaften**, v. 93, n. 3, p. 141-144, 2006.

THOMING, G.; KNUDSEN, G.K. Attraction of pea moth *Cydia nigricana* to pea flower volatiles. **Phytochemistry**, v. 100, p. 66-75, 2014.

THOMPSON, J.N; PELLMYR O.**Evolution of oviposition behavior and host preference in lepidóptera.** *Annual Rev. Entomol.*, 36: 65-89, 1990.

VENDRAMIM, J. D. O controle biológico e a resistência de plantas. In: PARRA, J. R. P., BOTELHO, P. S. M., CORRÊA-FERREIRA, B. S., BENTO, J. M. S. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 125-142. 2002.

**7. Capítulo IV - Formulação eficaz na atração de machos virgens de *C. anonella*, BASEADA NA COMBINAÇÃO SINÉRGICA DE EXTRATOS DE PLANTAS FRUTIFICADAS DE *Annona squamosa* COM O FEROMÔNIO SEXUAL DE FÊMEAS DE *C. anonella***

**FORMULAÇÃO EFICAZ NA ATRAÇÃO DE MACHOS VIRGENS DE *C. anonella*, BASEADA NA COMBINAÇÃO SINÉRGICA DE EXTRATOS DE PLANTAS FRUTIFICADAS DE *Annona squamosa* COM O FEROMÔNIO SEXUAL DE FÊMEAS DE *C. anonella***

**RESUMO**

Dentre os problemas fitossanitários que acometem as plantas de *Annona squamosa*, a incidência de pragas é um dos principais fatores de redução da sua produtividade. A broca *Cerconota anonella* é uma das principais pragas que ocasiona graves danos a esta cultura e a ausência de uma forma de controle específica para machos dessa espécie contribui para o aumento dos danos econômicos decorrentes da infestação deste inseto nos plantios comerciais desta frutífera. A presente estudo objetivou verificar a associação do extrato frutificado de *A. squamosa* com o feromônio sexual na potencialização da atração de machos virgens. Os resultados obtidos demonstraram a sinergia existente na formulação da mistura na proporção de (1:1) entre os componentes do feromônio e os constituintes químicos presentes no extrato da fase frutificada. Estes resultados demonstram, pela primeira vez, a evidência de sinergia entre os voláteis produzidos por fêmeas e aqueles liberados pela planta hospedeira *Annona squamosa* na atração de machos virgens coespecíficos, podendo ser utilizado em estratégia de controle, baseada na atração de machos virgens de *C. anonella*, visando diminuir o número de acasalamentos e, conseqüentemente reduzir os danos causados por este inseto nos plantios comerciais de *A. squamosa*, em virtude da diminuição da população desta praga.

**Palavras-chave:** Potencialização; Cairomônio; Frutificada.

## 7.1 INTRODUÇÃO

A família das anonáceas compreende um grupo de frutíferas de importância econômica em vários países, dentre eles o Brasil, pois suas plantas apresentam frutos que possuem altos preços nos mercados nacional e internacional. Além de serem estudadas por diversas áreas do conhecimento devido a sua aplicabilidade no ramo medicinal e industrial.

No primeiro trimestre de 2020, o Brasil exportou mais de 234 mil toneladas de frutas segundo a ABRAFRUTAS (2020). Dentre as frutíferas cultivadas em solo brasileiro, a pinheira (*Annona squamosa* L) destaca-se devido ao excelente sabor do seu fruto, que é muito utilizado na elaboração de purês, sorvetes, musses, iogurtes e sucos (RIBEIRO *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2008).

Dentre os problemas fitossanitários enfrentados por esta anonácea, a incidência de pragas é um dos principais fatores de redução da sua produtividade. A broca-do-fruto (*Cerconota anonella*) é considerada uma das mais nocivas pragas devido aos danos que causa a esta cultura, pois além de depreciar a qualidade dos frutos (devido a alimentação da polpa pelas lagartas), ainda facilita a entrada de vários organismos oportunistas (fungos e bactérias) no interior dos frutos (BRAGA SOBRINHO, 2014).

Devido a carência de informações e a não existência de produtos oficialmente registrados no MAPA em relação ao controle dessa broca em pinheiras, faz-se necessário a utilização de métodos alternativos, como é o caso do emprego de semioquímicos como cairomônios e feromônios, que venham a suprir esta lacuna (BURT, 2004; REDDY; GUERRERO, 2004).

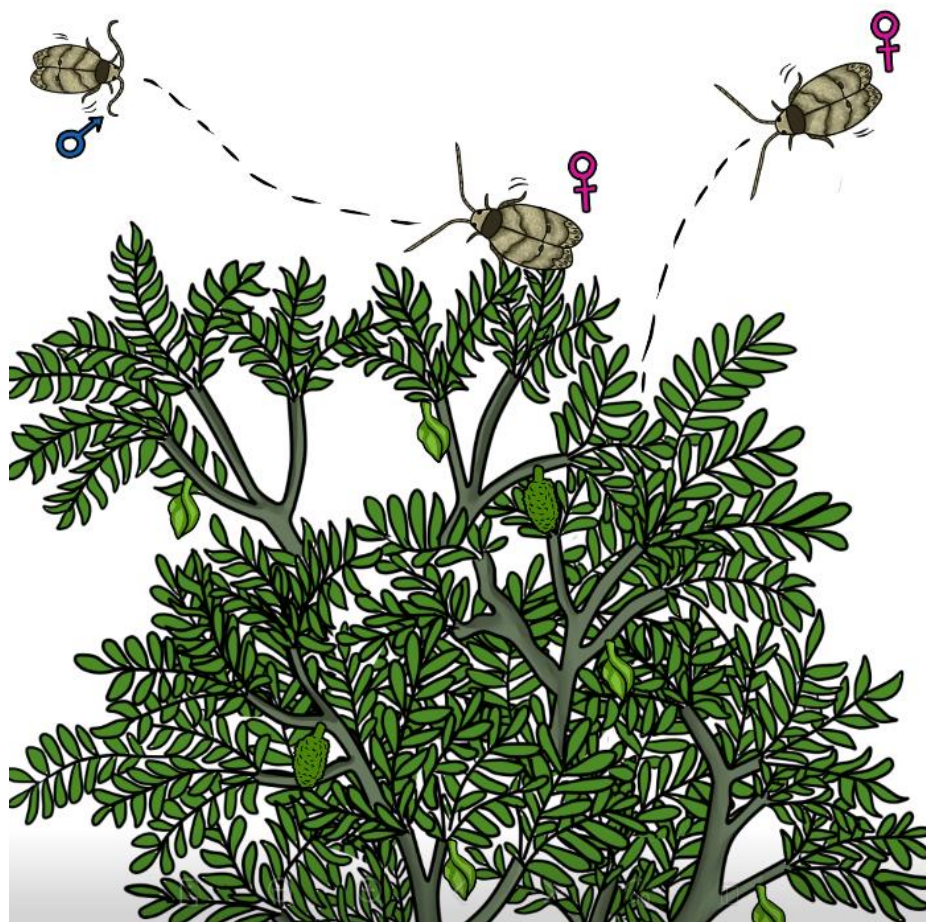
Estudos comprovam a importância da relação dos insetos herbívoros frente com seus respectivos hospedeiros. Essa integração pode gerar mudanças fisiológicas e/ou estimular comportamentos específicos nos insetos, tais como alimentação, acasalamento e oviposição. Isso se deve às interações estabelecidas entre os feromônios produzidos pelos insetos e os aleloquímicos liberados pela planta hospedeira (LANDOLT; PHILLIPS, 1997).

Os compostos voláteis presentes nas plantas hospedeiras podem desencadear uma atração mais acentuada em insetos quando liberados em associação com o feromônio sexual. Esta combinação pode resultar em

sinergismo, uma vez que a resposta desencadeada no organismo receptor é maior do que a observada quando o feromônio sexual ou os compostos voláteis da planta hospedeira são testados separadamente. A sinergia entre os semioquímicos de plantas e o feromônio sexual pode conferir ao inseto um maior sucesso no acasalamento, desempenhando, provavelmente, um papel importante no isolamento reprodutivo (REDDY; GUERRERO, 2004).

Os compostos voláteis liberados por plantas e frutos hospedeiros afetam diretamente no comportamento de busca e reprodução de machos e fêmeas de lepidópteros, atuando como sinalizadores que orientam fêmeas para locais de oviposição e os machos virgens para os sítios de acasalamento (**Figura 1**).

**Figura 1-** Esquema da interação de *C. anonella* pelos semioquímicos.



Fonte: Autor, 2020.

A utilização dos semioquímicos no controle de insetos-praga tem como principal entrave a liberação destes compostos, visto que eles apresentam alta volatilidade, fazendo com que seja necessário a determinação de parâmetros



específicos, como a taxa de liberação ou a composição do atraente, para garantir a efetividade na atração.

Os semioquímicos devem ser impregnados em materiais conhecidos como liberadores, que apresentam a propriedade de liberar os compostos a uma taxa relativamente constante, durante o período de captura do inseto-alvo, o que pode variar de alguns dias a diversos meses (EVALDO F.; DELLA LUCIA, 1987).

Dentre os liberadores utilizados, a quitosana é um biopolímero promissor, de origem natural, proveniente da desacetilação da quitina, um polissacarídeo presente no exoesqueleto de animais como crustáceos, moluscos e insetos (SONIA; SARMA, 2011). A quitosana pode ser utilizada em um processo denominado de microencapsulação, promovendo uma camada polimérica que isola ou protege os compostos bioativos, atuando como uma barreira contra os diversos fatores ambientais, que podem vir a liberar o material sob condições específicas e, ainda, em taxas controladas de velocidade e de quantidade (JANSSON-CHARRIER *et al.*, 1996; HEUSKIN *et al.*, 2011).

O presente trabalho se propôs a investigar a existência de sinergismo entre o feromônio sexual liberado por fêmeas virgens de *C. anonella* e os compostos voláteis liberados pela planta hospedeira, na atração de machos de *C. anonella*, visando a obtenção de uma ferramenta eficaz na atração de machos coespecíficos, para minimizar o problema enfrentado pelos produtores destes frutos, no que se refere ao ataque da praga em questão, pelo uso de uma formulação contendo a mistura destes semioquímicos.

## **7.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **7.2.1 Coleta e armazenamento dos frutos infestados para obtenção dos insetos adultos**

Frutos infestados com lagartas da broca-dos-frutos, *C. anonella* foram coletados no município de Coruripe-AL (10°09'54''S; 36°21'07''W) e levados para o laboratório de Ecologia Química, do Instituto de Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os frutos maduros e verdes, com sinais de infestação da praga *C. anonella*, foram armazenados

em gaiolas de madeira (30 cm de largura x 30 cm de comprimento x 30 cm de altura) com as laterais cobertas por tela de material plástico, para facilitar a ventilação.

### **7.2.2 Manutenção dos Insetos**

Os frutos infestados foram utilizados para a remoção das lagartas de *C. anonella*. Com o auxílio de luvas e pinças, as lagartas foram individualmente retiradas e mantidas em placas de Petri de acrílico contendo dieta artificial de realimentação, sendo mantidas em laboratório para criação até obtenção das pupas. A dieta para a alimentação das lagartas foi constituída pelos seguintes ingredientes: gérmen de trigo, cloridrato de colina, sais de Wesson, ácido ascórbico, farelo de soja, açúcar, nipagin, ácido sórbico, ágar-ágar, solução vitamínica, formol, ambrasinto, vita gold e água destilada e foi preparada conforme metodologia já estabelecida (Silva, 2004). No estágio de pupa, fêmeas e machos foram sexados com o auxílio do microscópio, baseado na presença de poro genital, presente em machos e, ausente em fêmeas. Em seguida, foram colocadas em placas forradas com algodão umedecido com água destilada e uma solução de sulfato de cobre a 1%, cobertas com papel filtro e mantidas em câmara de vidro (9 cm de largura x 16 cm de comprimento x 9,5 cm de altura) devidamente etiquetadas, onde se encontrava um recipiente de vidro contendo o alimento (solução de mel em água a 10%). Após a emergência dos insetos adultos, fêmeas e machos virgens foram colocados em câmaras de vidro (9 cm de largura x 16 cm de comprimento x 9,5 cm de altura) devidamente identificadas, contendo alimento. Os machos virgens foram utilizados em bioensaios posteriores. Este procedimento ocorreu em sala climatizada ( $24,1^{\circ}\text{C} \pm 1,2$  e  $65\% \text{ UR} \pm 1,9$ ), com fotoperíodo invertido (12h:12h), no horário das 8h às 12h.

### **7.2.3. Obtenção das Plantas**

As plantas utilizadas nos experimentos foram pinheiras (*A. squamosa*) no estágio frutificado cultivadas pelo Laboratório de Biologia vegetal BIOVEG - CECA-UFAL, situado no Campus Delza Gitaí, no município de Rio Largo, Alagoas ( $7^{\circ}27'57''\text{S}$ ;  $34^{\circ}50'1''\text{W}$ ).

#### 7.2.4 Obtenção dos extratos das plantas de pinha frutificada

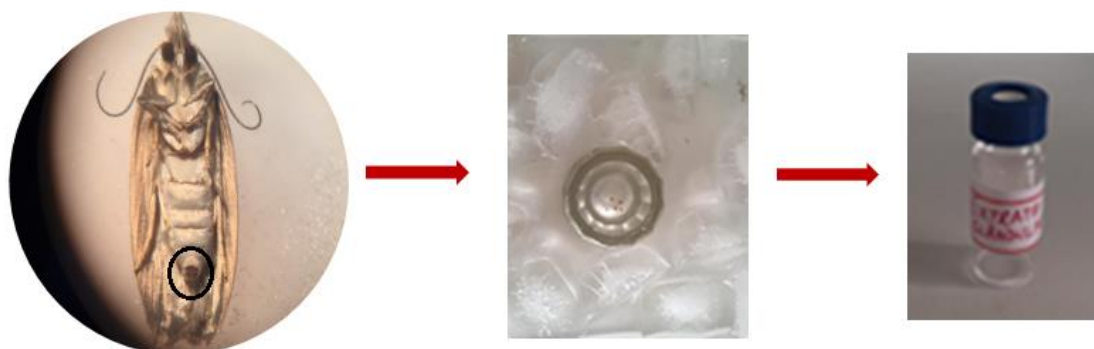
Os extratos de plantas de *A. squamosa*, no estágio frutificado, foram obtidos pelo uso da técnica de aeração, também conhecida como headspace dinâmico, utilizando sacos plásticos, hermeticamente fechados, contendo em uma das extremidades (entrada) um tubo com carvão ativo, que serviu como filtro para purificar o ar que entrava no sistema, e na outra extremidade (saída) existia um segundo tubo contendo um polímero adsorvente, neste caso, 150 mg de Tenax<sup>®</sup> (Supelco, diâmetro poroso de 60-80 mesh), para adsorver as substâncias voláteis liberadas pelas plantas. Uma bomba de ar foi conectada na extremidade contendo o tubo de carvão ativado e a corrente de ar (filtrada com carvão ativo) que entrava, passava no interior do saco e seguia em direção ao tubo contendo o adsorvente (Tenax<sup>®</sup> TA). A aeração foi processada por um período de 24 horas.

Os compostos voláteis liberados pelas plantas foram dessorvidos da superfície do adsorvente, Tenax<sup>®</sup>, através da passagem de 1 mL de hexano (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>) bidestilado (Sigma- Aldrich, grau HPLC). Os extratos foram armazenados em ampolas com capacidade de 2 mL. Em seguida, as ampolas foram seladas, identificadas e mantidas em freezer para uso posterior nos bioensaios comportamentais.

#### 7.2.5 Obtenção de extratos de glândulas abdominais de *C. anonella*

Dez fêmeas virgens de *C. anonella*, com idade variando entre 2-3 dias e apresentando o comportamento de chamamento, foram retiradas das gaiolas de manutenção e levadas ao freezer (-5°C) localizado no Laboratório de Ecologia Química (IQB-UFAL), durante 5 minutos, para fins de imobilização e de manutenção das condições fisiológicas da glândula produtora do feromônio. Ao término desse período, as fêmeas foram retiradas do freezer e, com auxílio de um bisturi, o sétimo e oitavo segmentos abdominais de cada fêmea foram cortados e mantidos em uma cuba de vidro, onde permaneceram em contato com 100 µL de hexano por cerca de 30 segundos. Durante todo o processo de preparação dos extratos, a cuba foi mantida imersa em gelo, a fim de evitar a evaporação do solvente. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, o extrato obtido foi transferido para um tubo, tipo *vial*, anteriormente identificado e levado ao freezer para posterior utilização nos bioensaios (**Figura 2**).

**Figura 2-** Fluxograma para a obtenção dos extratos de glândulas produtoras de feromônio sexual.



Fonte: Autoria própria (2020)

### 7.2.6 Obtenção das formulações dos extratos e mistura

As formulações foram preparadas utilizando 10  $\mu$ L dos extratos individuais/mistura adsorvidos em 10 mg do substrato biopolimérico quitosana, por um período de 24 horas, em uma sala com temperatura controlada (25°C), as quais foram colocadas em eppendorfs e testadas posteriormente com machos virgens de *C. anonella*.

### 7.2.7 Ensaios de laboratório com as formulações

Para avaliar os comportamentos exibidos por machos virgens de *C. anonella*, os bioensaios foram conduzidos em sala climatizada, com temperatura média de 26,2°C e umidade relativa média de 40%, do laboratório de Ecologia Química (UFAL), durante a escotofase, no período das 8:00 às 12:00 h. Foram utilizados machos virgens de *C. anonella*, com idade variando entre 2 a 5 dias, utilizando um ofatômetro com Tubo bifurcado acoplado a ampla área de monitoramento retangular, que é formado por um conjunto geral composto de uma tampa (comprimento 19,5 cm x largura 13,2) para entrada de ar, um tubo bifurcado tipo Y (54,2 cm de comprimento x 23 cm de largura) composto por dois braços, onde cada braço apresenta uma entrada para amostra (diâmetro de 14 cm). Acoplado a esse tubo bifurcado há uma área de monitoramento retangular-arena confeccionada em acrílico transparente (comprimento 19,5 cm x largura 13,2), apresentando de um lado duas saídas circulares que servem como conexão para as bifurcações do tubo e do outro

lado uma entrada provida de uma tampa em material de malha e elastano, destinada a inserção dos insetos e uma bomba para introdução de ar no interior do olfatômetro, o qual foi purificado mediante passagem prévia em filtro de carvão ativo. Pelo fato dos bioensaios serem realizados no escuro, os mesmos foram conduzidos com auxílio de uma luz vermelha, para visualização do comportamento do inseto.

As formulações testadas foram adicionadas em um dos braços do sistema do “Y”, e foram substituídos a cada bioensaio. A formulação foi considerada preferencial, quando atraiu os insetos ou provocou algum comportamento específico (antenação, voo curto e/ou voo longo orientado) em direção ao mesmo. As posições dos tratamentos foram alteradas entre os braços do olfatômetro para evitar qualquer efeito tendencioso de habituação.

Nos bioensaios foram testadas as seguintes formulações (tratamentos): extrato de glândulas produtoras de feromônio sexual extraídas de fêmeas virgens de *C. anonella*, extrato de planta de *A. squamosa* no estágio frutificado, a mistura constituída pelo extrato contendo o feromônio sexual e o extrato de *A. squamosa* no estágio frutificado na proporção de 1:1 e hexano (controle). Foram realizadas 12 repetições para cada tratamento, utilizando um macho virgem em cada repetição, com período de observação de 15 minutos.

#### **7.2.8 Análises estatísticas**

Os dados obtidos nos bioensaios foram analisados primeiramente com a finalidade de verificar os pressupostos paramétricos de normalidade e homogeneidade das variâncias dos tratamentos. Uma vez que os parâmetros de normalidade não foram atendidos, o teste não-paramétrico de Wilcoxon ( $P < 0,05$ ) foi aplicado a fim de verificar quais tratamentos influenciaram no comportamento de atratividade para fêmeas acasaladas e machos virgens. Todas as análises estatísticas foram executadas no programa Origin 8.

## 7.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

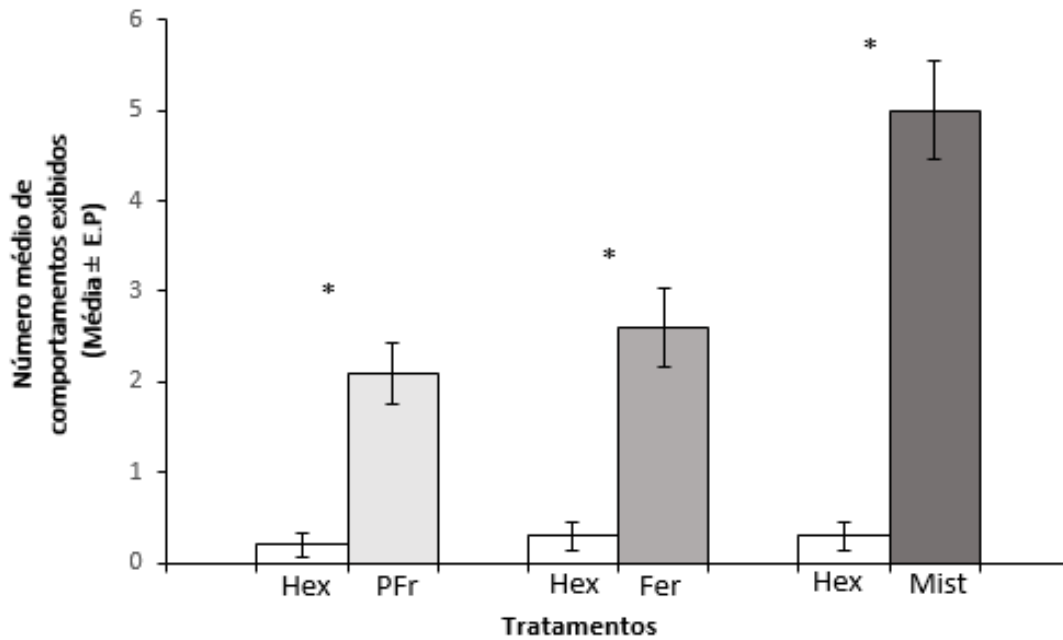
### 7.3.1 Resposta de machos de *C. anonella* para extratos da planta de *A. squamosa*, extratos de feromônio sexual e misturas contendo os dois extratos

Nos bioensaios, foi identificado em machos virgens de *C. anonella* os comportamentos de antenação, voo curto e voo longo orientado para a fonte de odor e toque e permanência na fonte de odor na presença dos extratos: das plantas estágio de maturação frutificado, de feromônio e da mistura (planta no estágio de maturação frutificado e feromônio, na proporção de 1:1).

Com exceção do hexano, machos virgens de *C. anonella* foram atraídos para todos os tratamentos testados, exibindo os comportamentos de antenação, voo curto e voo longo orientado para a fonte de odor, pouso e permanência na fonte de odor (**Figura 1**). Dentre os tratamentos, um maior número de machos foi atraído para a mistura constituída pelo extrato contendo o feromônio sexual e o extrato de *A. squamosa* no estágio frutificado na proporção de 1:1, como pode ser visto na **Figura 3**.

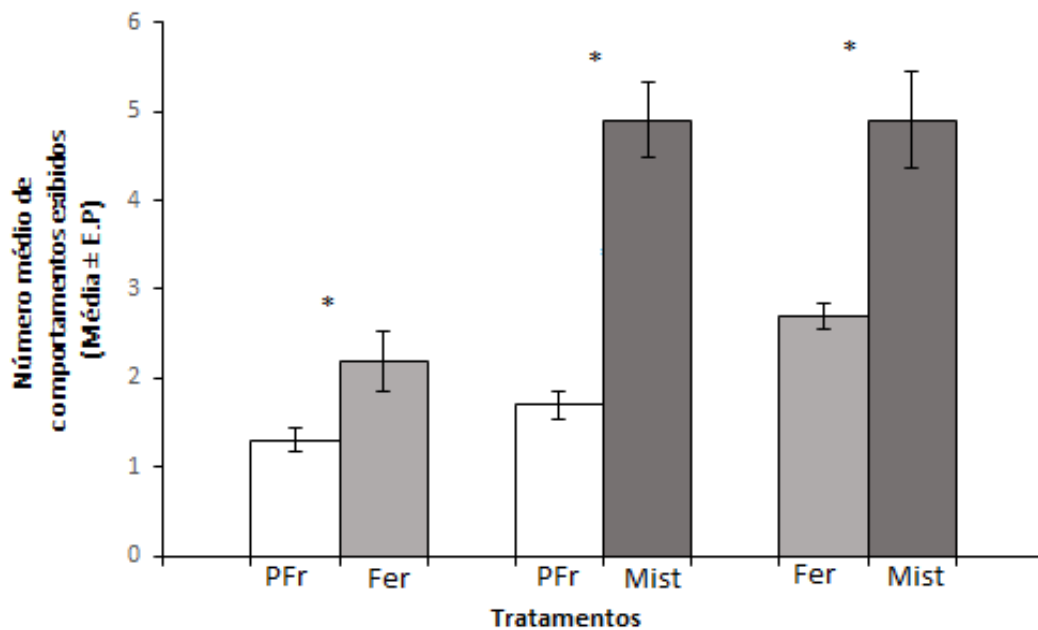
Comparando-se as respostas dos machos para os extratos testados, constatou-se a preferência destes pela mistura constituída pelo extrato contendo o feromônio sexual e o extrato de *A. squamosa* no estágio frutificado na proporção 1:1, seguida do extrato contendo o feromônio sexual de fêmeas virgens de *C. anonella* (**Figura 4**).

**Figura 3-** Atratividade machos para extratos de pinheira, feromônio, mistura (extratos de pinheira + feromônio) e o hexano.



Nota: Hexano (Hex); Planta Frutificada (PFr); Feromônio (Fer); Mistura (Mist). \* indica que houve diferença estatística significativa pelo teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ).

**Figura 4-** Atratividade preferencial de machos para extratos de pinheira, feromônio e mistura (extratos de pinheira + feromônio).



Nota: Planta Frutificada (PFr); Feromônio (FER); Mistura (MIST). \* indica que houve diferença estatística significativa pelo teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ).

Segundo Wang (2008), os semioquímicos mais importantes para os insetos são os compostos voláteis da planta hospedeira e os feromônios liberados pelos insetos, visto que a combinação destes (efeito sinérgico) pode modular o seu comportamento.

Alguns voláteis ativos de plantas têm um efeito sinérgico com feromônios sexuais ou agem como repelentes de insetos que são aplicados para controlar pragas de insetos no campo (LIGHT *et al.*, 1993; RICHARD; THACKER; TRAIN, 2010).

Os insetos produzem ou liberam feromônios sexuais em resposta a sinais específicos da planta hospedeira e as substâncias voláteis oriundas de plantas hospedeiras frequentemente potencializam (efeito sinérgico) a resposta de um inseto aos feromônios sexuais. As interações entre semioquímicos da planta hospedeira e feromônios dos insetos foram reconhecidas como um sistema de comunicação essencial dentro das espécies (REDDY; GUERRERO 2004).

Quando comparados aos feromônios sexuais de lepidópteros que atuam especificamente, atraindo apenas machos coespecíficos; os voláteis de plantas exercem a vantagem de influenciar as fêmeas de insetos, promotoras dos danos causados as plantas hospedeiras e principal alvo de controle no manejo de pragas (LI *et al.*, 2017; MECHABER *et al.*, 2002, ). Os voláteis das plantas podem ser empregados em estratégias eficientes de proteção de culturas por atuarem de forma específica e não serem prejudiciais para o meio ambiente.

O perfil dos voláteis liberados pelas plantas pode mudar conforme a variedade e estágios fenológicos da planta hospedeira, podendo ser: vegetativo, florado ou frutificado (HARE, 2011; ZHU; PARK, 2005).

Os voláteis da planta hospedeira também podem provocar um efeito positivo sobre o comportamento de insetos que determina o nível de especialização entre eles. Este efeito pode resultar em sinergismo em que a resposta para a mistura do feromônio sexual e os compostos voláteis da planta é maior do que quando se leva em consideração os resultados de atração para cada um dos extratos que compõe a mistura com ação sinérgica (REDDY; GUERRERO, 2004).

As respostas dos machos de *C. anonella* decorrente da interação entre o feromônio sexual e o extrato da pinheira é de grande relevância em estudos



relacionados ao uso de semioquímicos. As respostas olfatórias de lepidópteros para odores de plantas são conhecidas por serem muito importantes na localização do hospedeiro. Assim, uma mudança de hospedeiro ou estágio fenológico envolve uma alteração na preferência pelo mesmo (THOMPSON; PELLMYR, 1990), podendo aumentar ou diminuir a atração.

Machos e fêmeas de *Anaglyptus subfasciatus* (Cerambycidae), pragas florestais mais prejudiciais do Japão, são atraídos pelo cedro japonês e pelo cipreste japonês para alimentação. A mistura de acetato de metilfenila, um dos constituintes florais do hospedeiro, com o feromônio sexual liberado pelos machos foram significativamente mais atraentes para as fêmeas do que o feromônio ou o éster sozinho (NAKAMUTA *et al.*, 1997).

No momento em que se detecta um parceiro, o sistema olfativo do inseto é confrontado não apenas com feromônios sexuais, mas também pela presença de odores de fundo, como é o caso dos voláteis de plantas (REISENMAN; LEI; GUERENSTEIN, 2019).

Os estudos conduzidos por Varela *et al.* (2011), utilizando uma mistura contendo cinco compostos voláteis presentes no pessegueiro, para determinar se os voláteis da planta hospedeira em associação à mistura sintética de feromônio sexual potencializavam comportamentos exibidos por machos da mariposa da maçã, *Grapholita molesta* em condições de laboratório, demonstraram que, quando estes compostos voláteis são associados ao feromônio sexual das fêmeas desencadeiam um aumento da atratividade de machos desta espécie para a mistura testada, evidenciando a sinergia entre os constituintes químicos presentes na mistura testada.

A demonstração da potencialidade da atração sexual induzida pela combinação do feromônio sexual de um inseto em particular com os odores do hospedeiro pode servir para a obtenção de iscas eficazes para uso em armadilhas para o manejo de pragas de insetos. Iscas baseadas apenas em feromônios sintéticos têm pouca probabilidade de serem competitivas com sinais provenientes de alimentos ou plantas (REDDY; GUERRERO, 2004).

Tem sido bastante difundida a pesquisa com semioquímicos, pois apresenta vantagens importantes do ponto de vista ambiental, principalmente por apresentar alta especificidade, caráter atóxico e eficácia em baixas concentrações (PIRES, 2013).

## 7.4 CONCLUSÕES

A formulação da mistura (planta no estágio de maturação frutificado e feromônio) apresentou ação sinérgica, quando testados com machos virgens de *C. anonella*. A mesma é inteiramente ecológica, pois são substâncias produzidas e utilizadas pelo próprio inseto e dessa forma age especificamente sem interferir em organismos não alvos.

É economicamente viável, devido ao seu baixo custo com relação a mão de obra utilizada para a aplicação, ambientalmente correta, pode ser aplicado no desenvolvimento de iscas formuladas a base de extrato de *A. squamosa* no estágio frutificado e de feromônio sexual para a captura de fêmeas acasaladas e machos virgens de *C. anonella*, visando minimizar os seus impactos nessa cultura.

Surge como uma nova possibilidade para uso no controle por comportamento da praga em estudo, podendo servir, como mais um método para ser agregado ao Manejo Integrado de Pragas (MIP), principalmente para diminuir o número de acasalamento e, conseqüentemente promover a diminuição da população deste inseto-praga em plantios comerciais de *A. squamosa* e *A. muricata*.

## 7.5 REFERÊNCIAS

ABRAFRUTAS. **Estatísticas de exportações de frutas**, Disponível em <<https://abrafrutas.org/dados-estatisticos/>> acesso em Jul 2020.

ARAÚJO, J. F.; LEONEL, S.; & NETO, J. P. dubação organomineral e biofertilização líquida na produção de frutos de pinheira (*Annona squamosa* L.) no submédio São Francisco, Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 24, n. 4, p. 48-57, 2008.

BRAGA SOBRINHO, R. Produção integrada de Anonáceas no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. SPE1, p. 102-107, 2014.

BURT, S. Óleos essenciais: suas propriedades antibacterianas e possíveis aplicações em alimentos - uma revisão. **Revista internacional de microbiologia alimentar**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

IVALDO F. V.; DELLA LUCIA, T. M. C., **Feromônios de Insetos: Biologia, Química e emprego no manejo de pragas**, Viçosa, UFV, Imprensa Universitária, 1987.

HARE, J.D.. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. **Annual Review of Entomology**, 56: 161-180, 2011.

HEUSKIN, S. et al. The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.** v. 15,

n. 3, p. 459-470, 2011.

JANSSON-CHARRIER, M. et al. Vanadium (IV) sorption by chitosan: kinetics and equilibrium. *Water Research*, v. 30, n. 2, p. 465-475, 1996.

LANDOLT, P. J.; PHILLIPS, T. W. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. **Annual Review of Entomology**, v. 42, n. 1 p. 371-391, 1997.

LI, N., LI, S., GE, J., SCHUMAN, M. C., WEI, J. N.; MA, R. Y. Manipulating two olfactory cues causes a biological control beetle to shift to non-target plant species. **Journal of Ecology**, 105, 1534– 1546, 2017.

LIGHT, D. M., FLATH, R. A., BUTTERY, R. G., ZALOM, F. G., RICE, R. E., DICKENS, J. C.; JANG, E. B. Host-plant green-leaf volatiles synergize the synthetic sex pheromones of the corn earworm and codling moth (Lepidoptera). **Chemoecology**, 4, 145– 152, 1993.

MECHABER, W. L., CAPALDO, C. T.; HILDEBRAND, J. G. Behavioral responses of adult female tobacco hornworms, *Manduca sexta*, to host plant volatiles change with age and mating status. **Journal of Insect Science**, 2, 1– 8, 2002.

NAKAMUTA, K. et al. Increase of trap catches by a combination of male sex pheromones and floral attractant in longhorn beetle, *Anaglyptus subfasciatus*. **J. Chem. Ecol.**, v.23, p. 1635 – 1640, 1997.

PIRES, E. V. **Extração e identificação dos componentes do feromônio sexual de broca dos frutos da pinha e da graviola, *Cerconota anonella* (SEPP., 1830) (Lepidoptera: Oecophoridae)**. Tese apresentada ao Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, 2013.

REISENMAN, C. E.; LEI, H.; GUERENSTEIN, P. G. Neuroetologia do comportamento guiado por olfativos e sua potencial aplicação no controle de insetos nocivos. **Fronteiras em fisiologia**, v. 7, p. 271, 2019.

REDDY, G. V.; GUERRERO, A. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. **Trends in plant science**, v. 9, n. 5, p. 253-261, 2004.

RIBEIRO, R. C. F. et al. Reação de diferentes anonáceas a *Meloidogyne javanica*. **Unimontes Científica**, v. 6, n. 2, p. 123-128, 2008.

RICHARD, J., THACKER, M.; TRAIN, M. R. Use of volatiles in pest control. In A. Herrmann (Ed.), **The Chemistry and Biology of Volatiles**, p. 151– 168, 2010.

SILVA, E.L. **Ecologia Química das Pragas das Anonáceas, *Bephratelloides pomorum* Fab. (Hymenoptera: Eurytomidae) e *Cerconota anonella* Sepp. (Lepidoptera: Oecophoridae) e da Cana-de-áçúcar, *Diatraea saccharalis* Fab. (Lepidoptera: Crambidae), com seus respectivos hospedeiros**. Tese apresentada ao Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, 2004.

SONIA, T. A.; SHARMA, C. P. Chitosan and Its Derivatives for Drug Delivery Perspective. **Advances in Polymer Science**, v. 243, p. 23-53, 2011.

THOMPSON, J.N; PELLMYR O. Evolution of oviposition behavior and host preference in lepidoptera. **Annual Rev. Entomol.**, 36: 65-89, 1990.

VARELA, N. et al. Synergism of pheromone and host-plant volatile blends in the attraction of *Grapholita molesta* males. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 141, n. 2, p. 114-122, 2011.

WANG, Z. H. et al. Synergism of plant volatiles to insect pheromones and related mechanisms. **Ying yong sheng tai xue bao= The journal of applied ecology**, v. 19, n. 11, p. 2533, 2008.

ZHU, J.; PARK, K. C. Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*. **Journal of Economic Entomology**, v.31, p.1733-1746, 2005.

## 8 CONCLUSÃO GERAL

Em resultado a tudo que foi exposto, este trabalho forneceu informações úteis para o estudo da biotecnologia, biologia, química e ecologia do Lepidóptera *C. anonella*, buscando entender melhor os mecanismos relacionados ao controle de pragas.

- Pelo levantamento patentário, foi possível perceber claramente a desaceleração das patentes, quanto a evolução dos artigos publicados. Servindo como indicativo para a baixa produção de produtos com cunho tecnológico com aplicação efetiva para a sociedade.
- Através das análises das sensilas foi evidenciada a diversidade estrutural presente na formação nas antenas das fêmeas, responsável pela alta sensibilidade do sistema olfativo desse inseto.
- Por meio da extração do DNA constatou-se a especificação da espécie para o gênero *Cerconota*, evidenciando ser *anonella*. Estudos posteriores merecem mais atenção quanto a diversidade desta praga integrado aos COV's.
- Pelos estudos comportamentais, químicos e eletrofisiológicos foi possível, respectivamente, identificar os estágios florado e frutificado como preferências, diversas classes de compostos foram evidenciadas destacando a classe dos terpenos como majoritária, entre as classes de compostos que eliciaram respostas nas antenas das fêmeas encontram-se os terpenos, ésteres, cetona e aldeído.
- Foi constatado o sinergismo para o extrato da mistura (planta no estágio de maturação frutificado e feromônio), quando testados com machos virgens de *C. anonella*.

## 9 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados obtidos até agora neste trabalho, faz-se necessário a continuidade aos estudos, refazendo as análises para plantas de *A. squamosa* em estágio frutificado, utilizando os compostos identificados visando realizar bioensaios em laboratório e campo, utilizando os compostos individuais e formulações de diferentes proporções e concentrações dos compostos identificados como bioativos.

**ANEXOS****1- Patentes, registros e trabalhos apresentados derivados da tese****Patentes depositadas:**

30/07/2020 870200094837  
09:47  
29409161921671180

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2020 015516 4

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

10/09/2020 870200114620  
14:06

29409181923446460

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de  
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

**Número do Processo: BR 10 2020 018455 5**

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 24464109000148

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

**Cidade:** Maceió

**Estado:** AL

**CEP:** 57072-970

**País:** Brasil

**Telefone:** 82-3214-1064

**Fax:** 82-3214-1035

**Email:** nit@propep.ufal.br



## Capítulo de livro aceito para publicação



PONTA GROSSA, 13 de julho de 2020.

### DECLARAÇÃO DE ACEITE

Após avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta editora, tenho a honra de informar que o artigo intitulado "ATRAÇÃO DE FÊMEAS DE CERCONOTA ANONELLA POR DIFERENTES ESTÁGIOS DE ANNONA MURICATA" de autoria de "RITA DE CÁSSIA CORREIA DA SILVA, MAXDOUGLAS DOS SANTOS, RUTH RUFINO DO NASCIMENTO", foi aprovado e encontra-se no prelo para publicação no livro eletrônico "Ciências Exatas e da Terra: Exploração e Qualificação de Diferentes Tecnologias 2ª" a ser divulgado em outubro de 2020.

Agradeço a escolha pela Atena Editora como meio de transmitir ao público científico e acadêmico o trabalho e parabenizo os autores pelo aceite de publicação.

Reitero protestos de mais elevada estima e consideração.

Prof.ª Dr.ª Antonella Carvalho de Oliveira  
Editor Chefe  
ATENA EDITORA  
PREFIXO EDITORIAL ISBN 93243  
PREFIXO EDITORIAL DOI 10.22533

## Capítulo de livro submetido para avaliação



Aracaju/SE, 29 de julho de 2020

### DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que recebemos o capítulo **O USO DE SEMIOQUÍMICOS DE ESPÉCIES DE ANNONA COMO ATRAENTES NO MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS: UM ESTUDO PROSPECTIVO** dos autores Rita de Cássia Correia da Silva; Maxdouglas dos Santos; Ruth Rufino do Nascimento e Adriana de Lima Mendonça para compor o livro digital **MAPEAMENTO TECNOLÓGICO TENDÊNCIAS COMPETITIVAS** da Backup Books Editora ([www.backupbooks.com.br](http://www.backupbooks.com.br)), e foi encaminhado para avaliação.

Cordialmente,

Suzana Leitão Russo  
Diretora Chefe da Backup Books Editora  
[Backup.books.editora@gmail.com](mailto:Backup.books.editora@gmail.com)  
CNPJ – 34663144000140

## Registro MT90069 do sequenciamento de DNA, depositado no GenBank.

### Cerconota anonella voucher AL219005 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial

GenBank: MT900609.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

```

LOCUS       MT900609                653 bp    DNA     linear   INV 24-AUG-2020
DEFINITION Cerconota anonella voucher AL219005 cytochrome c oxidase subunit I
            (COX1) gene, partial cds; mitochondrial.
ACCESSION   MT900609
VERSION     MT900609.1
KEYWORDS    .
SOURCE      mitochondrion Cerconota anonella
  ORGANISM  Cerconota anonella
            Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;
            Pterygota; Neoptera; Holometabola; Lepidoptera; Glossata; Ditrysia;
            Gelechioidea; Elachistidae; Stenomatinae; Cerconota.
REFERENCE   1 (bases 1 to 653)
  AUTHORS   Da Silva,Rd.C.C., Do Nascimento,R.R., Ribeiro-Junior,K.A.L. and
            Santana,A.E.G.
  TITLE     Extraction and characterization of kairomones from host fruits for
            Cerconota anonella
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 653)
  AUTHORS   Da Silva,R.C.C., Do Nascimento,R.R., Ribeiro-Junior,K.A.L. and
            Santana,A.E.G.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (18-AUG-2020) LPQRN/CECA, Universidade Federalde Alagoas,
            Av. Lourival Melo Mota, S/N, Maceio, ALAGOAS 570720900, Brazil
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..653
                     /organism="Cerconota anonella"
                     /organelle="mitochondrion"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /host="Annona muricata"
                     /specimen_voucher="AL219005"
                     /db_xref="taxon:2595460"
                     /sex="male"
                     /country="Brazil: Coruripe"
                     /lat_lon="10.100 S 36.366 W"
                     /collected_by="Rita de Cassia Correia da Silva"
                     /note="PCR_primers=fwd_name: LepF, rev_name: LepR"
     gene             <1..>653
                     /gene="COX1"
     CDS              <1..>653
                     /gene="COX1"
                     /codon_start=2
                     /transl_table=5
                     /product="cytochrome c oxidase subunit I"
                     /protein_id="QNH69777.1"
                     /translation="FIFGIWAGMLGTSLSLLIRAEI LGNPGSLIGDDQIYNTIVTAHAF
            IMIFFMVMPI M IGGFGNWL VPLMLGAPDMAFPRMNMMSFWLLP PSLTLLISSSIVESG
            AGTGWTVY PPLSSNIAHGSSVDLAI FSLHLAGISSILGAINFITTI INMRLNNSFD
            QMPLFWAVGITALLLLSLPVLAGAITMLLTDRLNLSFFDPAGGGDPILYQHLFW"
ORIGIN
  1 ttttattttt ggaatttgag caggaatact tggaaacttc cttagtttat taattcgagc
  61 tgaattaggt aaccctggct ctcttattgg tgatgatcaa atttataata ctattgtaac
  121 agctcatgca ttcattataa ttttttttat agtaatacct atcataattg gaggatttgg
  181 aaattgatta gtcccattaa tactaggagc ccctgatata gctttccac gaataataa
  241 tataagattt tgattgcttc ccccttcatt aactctttta atttcaagta gaattgttga
  301 aagaggagct ggaactggtt ggacagttta tcccccttta tcttcaaata ttgcccacgg
  361 aggaagatcc gtagatttag caatttttct tcttcattta gctggaattt cttcaattt
  421 aggggcaatt aattttatta caactattat taatatacgt cttcaataat tatcatttga
  481 tcaaatacct ttatttgttt gagcagtagg aattacagct cttttattac ttctgtccct
  541 ccctgtatta gctggagcta ttactatact ccttacagat cgtaatttaa atacttcatt
  601 tttcgacca gctgggggtg gagatccaat tctttaccaa catttattct gat
//

```

## Registro MT900610 do sequenciamento de DNA, depositado no GenBank.

### Cerconota anonella voucher AL219006 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial

GenBank: MT900610.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#) 

```

LOCUS       MT900610                640 bp    DNA        linear   INV 24-AUG-2020
DEFINITION  Cerconota anonella voucher AL219006 cytochrome c oxidase subunit I
            (COX1) gene, partial cds; mitochondrial.
ACCESSION   MT900610
VERSION     MT900610.1
KEYWORDS    .
SOURCE      mitochondrion Cerconota anonella
  ORGANISM  Cerconota anonella
            Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;
            Pterygota; Neoptera; Holometabola; Lepidoptera; Glossata; Ditrysia;
            Gelechioidea; Elachistidae; Stenomatinae; Cerconota.
REFERENCE   1 (bases 1 to 640)
  AUTHORS   Da Silva,Rd.C.C., Do Nascimento,R.R., Ribeiro-Junior,K.A.L. and
            Santana,A.E.G.
  TITLE     Extraction and characterization of kairomones from host fruits for
            Cerconota anonella
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 640)
  AUTHORS   Da Silva,Rd.C.C., Do Nascimento,R.R., Ribeiro-Junior,K.A.L. and
            Santana,A.E.G.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (18-AUG-2020) LPQRN/CECA, Universidade Federalde Alagoas,
            Av. Lourival Melo Mota, S/N, Maceio, ALAGOAS 570720900, Brazil
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..640
                       /organism="Cerconota anonella"
                       /organelle="mitochondrion"
                       /mol_type="genomic DNA"
                       /host="Annona muricata"
                       /specimen_voucher="AL219006"
                       /db_xref="taxon:2595460"
                       /sex="male"
                       /country="Brazil: Coruripe"
                       /lat_lon="10.100 S 36.366 W"
                       /collected_by="Rita de Cassia Correia da Silva"
                       /note="PCR_primers=fwd_name: LepF, rev_name: LepR"
     gene              <1..>640
                       /gene="COX1"
     CDS               <1..>640
                       /gene="COX1"
                       /codon_start=1
                       /transl_table=5
                       /product="cytochrome c oxidase subunit I"
                       /protein_id="QNH69778.1"
                       /translation="IWAGMLGTSLSLIRAEELGNPGSLIGDDQIYNTIVTAHAFIMIF
FMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFFPMNMSFWLLPPSLTLLISSSIVESGAGTG
WTVYPLSSNIAHGGSSVDLAIIFSLHLAGISSILGAINFITTIINMRLNLSFDQMPL
FVWAVGITALLLLSLPVLAGAITMLLTDRLNLSFFDPAGGGDPILYQHLFW"
ORIGIN
  1 atttgagcag gaactacttg aacttccctt agtttattaa ttcgagctga attaggtaac
  61 cctggctctc ttattgggtg tgatcaaat tataatacta ttgtaacagc tcatgcattc
121 attataatth tttttatagt aatacctatc ataattggag gatttggaaa ttgattatgc
181 cattaataac taggagcccc tgatatagct tccccacgaa taaataatat aagattttga
241 ttgcttcccc cttcattaac tcttttaatt tcaagtagaa ttgttgaaag aggagctgga
301 actggttgga cagtttatcc ccttttatct tcaaatattg cccacggagg aagatccgta
361 gatttagcaa ttttttctct tcaattagct ggaatttctt caattttagg ggcaattaat
421 tttattacaa ctattattaa tatacgtctt aataatttat catttgatca aataccttta
481 tttgtttgag cagtaggaat tacagctctt ttattacttc tgtccctccc tgtattagct
541 ggagctatta ctatactcct tacagatcgt aatttaaata cttcattttt cgaccagct
601 gggggtggag atccaattct ttaccaacat ttattctgat
//

```

## Trabalhos apresentados em eventos científicos nacionais

**Evento:** 70° Congresso Nacional de Botânica.

### Atração de Fêmeas de *Cerconota anonella* (Seep.1855) (Lep.: Depressariidae)

por Diferentes Estágios de *Annona muricata* L.

Santos, M. <sup>(1)</sup>; Silva, Rita de C. C. <sup>(1,2)</sup>; Nascimento, Ruth. R. <sup>(1)</sup> (1)Laboratório de Ecologia Química, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL, Brasil. (2)Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA/UFAL), Rio Largo – AL, Brasil; e-mail: maxdouglas00.ms@gmail.com

A fruticultura é um dos segmentos de maior importância do setor agrícola brasileiro, no qual destacam-se diversas frutíferas, como é o caso da pinheira e da gravioleira. A gravioleira (*Annona muricata* L.) apresenta grande importância econômica entre as espécies de anonáceas cultivadas no Brasil. Várias espécies de insetos-praga atacam esta espécie destacando-se o lepidóptero, ***Cerconota anonella***, que é considerado uma das mais sérias pragas devido aos danos que causa a cultura. Diante deste fato, o presente estudo objetivou estudar a atratividade de fêmeas da broca ***Cerconota anonella*** por plantas de *Annona squamosa* em três diferentes estágios de desenvolvimento, a saber: vegetativo, florado e frutificado; mediante o emprego de bioensaios comportamentais, os quais foram realizados em olfatómetro de vidro do tipo Y, utilizando-se fêmeas acasaladas desta espécie, com até 5 dias de idade. Os tratamentos testados consistiram de extratos de plantas de *A. muricata* em diferentes estágios fenológicos e o hexano (controle). Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ), sendo observado que quando comparados: os extratos de plantas em

362

**Evento:** 11° Encontro Brasileiro de Ecologia Química.



## XI ENCONTRO BRASILEIRO DE ECOLOGIA QUÍMICA XI BRAZILIAN MEETING ON CHEMICAL ECOLOGY

October 23-26, 2019  
Maceió, Brazil

### ATRAÇÃO DE FÊMEAS DE *Cerconota anonella* POR DIFERENTES ESTÁGIOS DE *Annona squamosa*.

Rita de Cássia Correia da Silva<sup>1</sup>; Maxdouglas dos Santos<sup>1</sup>; Ruth Rufino do Nascimento<sup>1</sup>; Paulo Milet-Pinheiro<sup>2</sup>; Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Alagoas; [at-ir@hotmail.com](mailto:at-ir@hotmail.com); <sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco.

**PALAVRAS-CHAVE:** COMPOSTOS VOLÁTEIS; *Anonaceae*; *Lepidoptera*.


**RESUMO:** A pinheira (*Annona squamosa*) apresentam destaque na fruticultura mundial e grande aceitação comercial. Sua produção se constitui como um importante fator de impacto econômico; entretanto um dos principais obstáculos à exploração econômica destas frutíferas é a existência de um complexo de pragas que atacam estas culturas, tendo como principal praga uma mariposa, a *Cerconota anonella*. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a atratividade de fêmeas de *C. anonella* aos compostos voláteis de plantas de *A. squamosa* em diferentes estágios de maturação (vegetativo, florido e frutífero) que atraem a broca e identificar os compostos voláteis de plantas de *A. squamosa* no estágio preferencial. Frutos de pinha brocados foram coletados em pomares do município de Coruripe-AL, para obtenção das lagartas, as quais foram mantidas em laboratório, sob dieta artificial, até a fase adulta. Os compostos voláteis emitidos por estas plantas foram coletados pela técnica de *headspace* dinâmico. Em seguida, bioensaios comportamentais foram realizados em olfatómetro de vidro do tipo Y utilizando-se fêmeas acasaladas de *C. anonella* com até 5 dias de idade para os testes de preferência pelos extratos. Posteriormente foram feitas as análises utilizando CG/MS. Nos bioensaios foi observado que o tratamento controle não exerce atração, quando comparados com os tratamentos testados. As fêmeas foram atraídas para plantas na fase de floração, porém a fase frutificada foi a preferencial. Dentre as classes de compostos identificados por CG-EM encontra-se terpenos, ésteres, álcoois, cetonas e aldeído. Estas informações sugerem que a praga pode estar presente no campo antes da frutificação.

**Evento:** II Encontro Regional de Estudos Agroambientais.

Acesse <https://doity.com.br/validar-certificado> para verificar se este certificado é válido. Código de validação: 91HPMM-A

**CERTIFICADO**

Certificamos que o trabalho: Estudo fitossociológico da comunidade infestante no pomar de pinha (*Annona squamosa* L.) no Município de Rio Largo – Alagoas na área temática Produção Vegetal, de autoria de: ERIKA ELIAS DA SILVA, EDILANY EULÁLIA BARROS DE ALBUQUERQUE, THATIANE CAROLINA DOS SANTOS, MAXDOUGLAS DOS SANTOS, CHRYSLANE BARBOSA DA SILVA, RITA DE CÁSSIA CORREIA DA SILVA, KELLY BARBOSA DA SILVA, JOÃO GOMES DA COSTA foi submetido e apresentado no II Encontro Regional de Estudos Agroambientais, realizado no período de 11/12/2019 à 13/12/2019.

  
M.Sc. João Manoel da Silva  
Comissão Científica

  
Dra. Tania Marta C dos Santos  
Comissão Organizadora

## 2- Patentes e publicações derivadas de pesquisas desenvolvidas em cooperação durante o doutoramento:

### Artigo publicado

Revista Craibeiras de Agroecologia  
v. 5, n. 1, p. e9435, 2020  
**Artigo Científico**



#### **Estudo fitossociológico da comunidade infestante no pomar de pinha (*Annona squamosa* L.) no Município de Rio Largo – Alagoas**

<sup>1</sup>Erika Elias da Silva, <sup>1</sup>Edilany Eulália Barros de Albuquerque, <sup>1</sup>Thatiane Caroline dos Santos Rocha, <sup>1</sup>Maxdouglas dos Santos, <sup>2</sup>Chryslane Barbosa da Silva, <sup>2</sup>Rita de Cássia Correia da Silva, <sup>2</sup>Kelly Barbosa da Silva, <sup>3</sup>João Gomes da Costa

<sup>1</sup>Centro de Ciências Agrárias - CECA/Campus Delza Gitai, Rio Largo - AL, e-mail: erikaalaaas@gmail.com; lannebarros@outlook.com; thaty.caroline21@gmail.com; maxdouglas00.ms@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Alagoas - UFAL/Campus A.C. Simões, Maceió – AL, e-mail: chryslane.silva91@gmail.com; at-ir@hotmail.com; kelly.barbosa.silva@gmail.com

<sup>3</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros, Rio Largo - AL, e-mail: gomes.costa@embrapa.br

**RESUMO:** A fruticultura tem ocupado um espaço promissor no Brasil, destacando-se no mercado internacional garantindo exportações e geração de renda. No entanto, vem passando por limitações decorrentes da interferência de plantas infestantes, estas tendem a competir por nutrientes necessários para o desenvolvimento da cultura, sendo necessária sua identificação para propor uma tática de controle viável. O objetivo foi realizar um estudo fitossociológico da comunidade infestante no pomar de pinha (*Annona squamosa* L.) no Município de Rio Largo – Alagoas. A coleta foi realizada no pomar de pinha em Rio Largo - AL e a quantificação das plantas foram conduzidos mediante a adoção do método quadrado inventário (1,0 x 1,0 m). O processo de identificação ocorreu com auxílio de livros didáticos e também foram calculados os parâmetros de frequência, frequência relativa, densidade, densidade relativa, abundância, abundância relativa, índice de valor de importância, índice de valor de importância relativa e massa seca relativa. Foram encontradas 17 espécies infestantes distribuídas em 11 famílias, apresentando altos valores de densidade e frequência. Portanto, foi possível verificar com o levantamento uma maior predominância de plantas pertencente em sua maioria às famílias Asteraceae, Euphorbiaceae e Poaceae na área do pomar de pinhas em Rio Largo - AL.

**Palavras-chave:** Fitossociologia, Infestação, Controle, Competição.

### Capítulos de livro submetidos – Aguardando publicação

#### CAIROMÔNIOS DE MOSCAS DAS FRUTAS

CS Silva<sup>1</sup>, JCG Santos<sup>1</sup>, LL Ferreira<sup>1</sup>, NC Aquino<sup>1</sup>, RF Tavares<sup>1</sup>, RCC Silva<sup>1</sup>, AL Mendonça<sup>2</sup> e RR Nascimento<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ecologia Química, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Campus Maceió, Avenida Lourival de Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, CEP: 57072-970, Maceió, Alagoas.

<sup>2</sup>Centro Universitário Tiradentes, Unidade Maceió, Avenida Gustavo Paiva, 5017, Cruz das Almas, CEP: 57038-000, Maceió, Alagoas.

#### FEROMÔNIOS DE MOSCAS DAS FRUTAS

CS Silva<sup>1</sup>, JCG Santos<sup>1</sup>, LL Ferreira<sup>1</sup>, NC Aquino<sup>1</sup>, RF Tavares<sup>1</sup>, R Cassia<sup>1</sup>, AL Mendonça<sup>4</sup> RR Nascimento<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ecologia Química, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Campus Maceió, Avenida Lourival de Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, CEP: 57072-970, Maceió, Alagoas.

2Centro Universitário Tiradentes, Unidade Maceió, Avenida Gustavo Paiva,  
5017, Cruz das Almas, CEP: 57038-000, Maceió, Alagoas.

### Patentes depositadas



01/11/2018 870180147317  
15:01  
  
29409161811509788

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de  
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2018 072563 7



17/10/2018 870180141629  
09:28  
  
29409161810066556

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de  
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2018 071320 5



14/01/2019 870190003883  
12:32  
  
29409161900165707

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de  
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2019 000681 1





08/03/2019 870190022238  
09:10  
  
29409161901989207

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de  
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2019 004541 8



08/03/2019 870190022245  
09:28  
  
29409161901989240

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de  
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2019 004543 4



22/05/2020 870200063478  
12:09  
  
29409161919090095

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de  
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2020 010265 6