



CENIRA MONTEIRO DE CARVALHO

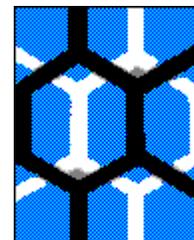
**Comportamento da Mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans*, (Diptera: Muscidae) frente aos
Compostos Orgânicos Voláteis de Diferentes Raças Bovinas**

MACEIÓ - ALAGOAS

2012



**PONTO FOCAL-ALAGOAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**



CENIRA MONTEIRO DE CARVALHO

**Comportamento da Mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans*, (Diptera: Muscidae)
frente aos Compostos Orgânicos Voláteis de Diferentes Raças Bovinas**

**Tese apresentada à Rede Nordeste de Biotecnologia como
parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, para obtenção do título de Doutor.**

Orientadora: Profa.Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio G. Sant'Ana

**MACEIÓ - ALAGOAS
2012**

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- C331c Carvalho, Cenira Monteiro de.
Comportamento da mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans*, (Diptera: Muscidae) frente aos compostos orgânicos voláteis de diferentes raças bovinas / Cenira Monteiro de Carvalho. – 2012.
94 f. : il. tabs., grafs.
- Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart .
Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2012.
- Bibliografia: 81-88.
Apêndices: 89-94
1. Ecologia química. 2. Bovinos. 3. Mosca-dos-chifres. 4. *Haematobia irritans* . 5. Semioquímicos. 6. Sanidade animal. 7 . compostos orgânicos voláteis. I. Título.

CDU: 547.21:599.735.5

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: Cenira Monteiro de Carvalho

TÍTULO DO PROJETO: "Comportamento da Mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans*, (Diptera: Muscidae) frente aos compostos orgânicos voláteis de diferentes raças bovinas"

PROFESSORA ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Marília Oliveira Fonseca Goulart

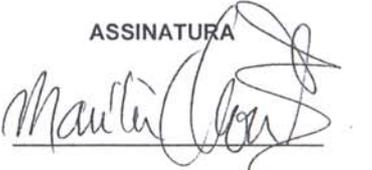
BANCA EXAMINADORA:

CONCEITO

ASSINATURA

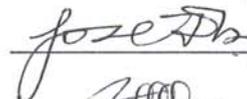
Prof^a. Dr^a. Marília Oliveira Fonseca Goulart - UFAL
(Orientadora - Presidenta)

A



Prof. Dr. José Ferreira Nunes - UECE
(Examinador)

"A"



Prof. Dr. Ervino Bleicher - UFC
(Examinador)

A



Prof^a. Dr^a. Angelina Bossi Fraga - UFAL
(Examinadora)

A



Prof. Dr. Cícero Eduardo Ramalho Neto - UFAL
(Examinador)

A



DATA DA APROVAÇÃO: 31 de julho de 2012.

HORÁRIO: 9:36h

LOCAL: Auditório do Núcleo de Pesquisa Multidisciplinar da Universidade Federal de Alagoas.

Dedicatória

À flor mais bela do meu jardim, minha mãe, **Eunice Galdino de Carvalho**, exemplo de ser humano, que, mesmo em tempos difíceis sempre soube ser forte para nos mostrar o que a vida tem de mais belo. Ao meu querido pai **Anivaldo Monteiro de Carvalho** (*in memoriam*) que em tão pouco tempo de convívio conosco, nos preparou para esta vida.

Às pedras preciosas que fazem parte da minha vida, **Carlos Kleber** (Linhos) e ao meu pequeno Klebinho, que com sua paciência infinita e seu amor, souberam sempre perdoar meus defeitos e as minhas ausências;

Aos meus amados irmãos: **Janice, Iara, Tânia, Márcia, Nádia, Jeane, Jussara e Jarbas**, sempre amigos e carinhosos;

Enfim, aos meus **maravilhosos sobrinhos** que me permitem participar das suas vidas, compartilhando seus projetos e suas alegrias, tornando assim nossa convivência harmoniosa.

Obrigado Senhor,

Porque és meu amigo, porque sempre comigo tu estás a falar: no perfume das flores, na harmonia das cores e no mar que murmura o teu nome a rezar.

Escondido Tu estás, no verde das florestas, nas aves em festa, no sol a brilhar. Na sombra que abriga, na brisa amiga, na fonte que corre ligeira a cantar.

Te agradeço ainda porque na alegria ou na dor de cada dia posso Te encontrar. Quando a dor me consome, murmuro o Teu nome e mesmo sofrendo, eu posso cantar, ***Obrigado Senhor.***

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **Marília Oliveira Fonseca Goulart** por permitir que eu fizesse parte do seu selecionado grupo de alunos, pelas lições de ler para aprender e tentar não errar nas escritas e nas apresentações dos trabalhos, pelo incentivo de ir à busca do novo sempre, pelo investimento nas viagens que me proporcionaram bastante conhecimento e amadurecimento acadêmico e pela amizade. Por tudo isso meu eterno agradecimento e reconhecimento.

Ao Prof. Dr. **Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana** pelo apoio desde o momento que cheguei à Universidade Federal de Alagoas (UFAL), pelo conhecimento passado de uma forma prática, por ser essa ciência ambulante que tanto nos incentiva a buscar conhecimentos através da leitura, por todas as oportunidades oferecidas sem medir esforços é que agradeço sua bondade e amizade.

À Profa. Dra. **Angelina Bossi Fraga** pela colaboração no projeto de tese, que foi de grande importância para que ele se realizasse de forma gloriosa, pela sua amizade e transmissão de seus conhecimentos sempre indispensáveis, pelas nossas viagens maravilhosas sempre proporcionando novas informações, na área animal.

A Profa. Dra. **Maria Cristina Cãno de Andrade** pela amizade, pelo acolhimento em seu laboratório e por sempre estar disposta acompanhando o desenvolvimento deste trabalho. Fico eternamente grata por tê-la como colaboradora e deixo claro que sua participação foi de grande importância.

Ao Dr. **Mike A. Birkett** pela colaboração neste trabalho e por permitir a realização de parte deste trabalho no Instituto de Rothamsted Research, Harpenden-UK.

À Dra. **Maria Carolina Brassioli Moraes** (CENARGEN-EMBRAPA) pela orientação no uso das técnicas cromatográficas e pelo companheirismo durante o período em que nos encontramos no Instituto de Rothamsted, que não permitiu que eu me sentisse um peixe fora do aquário e nem tão sozinha, já que estava tão longe de minha família. Seus ensinamentos foram e serão de grande valia para o desenvolvimento deste e de outros trabalhos que por ventura aparecerem.

Ao amigo Dr. **João Gomes da Costa** pela amizade, pela paciência e bondade de sempre estar contribuindo, mesmo quando não podia. Sua colaboração foi de fundamental importância.

À minha amiga doutoranda **Edjane Vieira Pires** antes de tudo pela sua amizade fiel, pela sua colaboração indispensável neste trabalho, pela nossa harmonia, pelos momentos felizes que tivemos.

À banca avaliadora da tese, composta pelos Drs. **Angelina Bossi, Ervino Bleicher, José Ferreira Nunes e Cícero Eduardo Ramalho**, que através dos seus grandes conhecimentos proporcionaram a melhoria deste trabalho.

À amiga **Rose Paula Mendonça** pela nossa amizade e nossas confissões e alegrias em nossas caronas amigas.

Às amigas **Cristhiane Basílio, Maria Emília Menezes e Maria Jaqueline dos Santos**, obrigada pelos momentos felizes que passamos juntas.

Às amigas **Carla Karine Barbosa e Maria Beatriz Farias** pela valiosíssima parceria no Laboratório de Bioensaio Moluscicida.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais: **Alessandro Riffel, Ana Lucila Costa, Andréa Vanderlei, Benísio Silva, Daniel Lira, Daniel Moraes, Danniele Lima, Domingos Luzitaneu Macuvele, Edilson Alves, Élica Guedes, Érica Verena, Grazielle Silmara, Henrique Goulart, Isis Torres, Ingrid Sofia Vieira, Jaim Oliveira, Júnia Porto, Karlos Ribeiro, Kirley Marques, Luciana Viana, Mariana Oliveira, Pedro Aquino, Thiago Ribeiro, Wbyratan Luiz da Silva, Vanderson Barbosa** e os demais que já passaram por aqui, em outros tempos, onde vivemos em uma grande família, com confissões, alegrias, comilanças, discussões acadêmicas, liberdades, enfim muita diversão e troca de harmonia. A todo esse povo, meu carinho e meu muito obrigada do fundo do meu coração.

Aos meus queridos amigos **Moaceli Freire e Ítalo Almeida** que sempre que puderam, auxiliaram na coleta do material em campo e na criação da mosca em laboratório, meu eterno agradecimento e carinho e um desejo de muito sucesso em suas vidas.

Ao meu querido sobrinho, Marcelo James Gonçalves de Oliveira Júnior, **Marcelinho**, que tanto me ajudou nas coletas, meu carinho e admiração.

Aos amigos **Aldy dos Santos e Margarida Teodoro** sempre presentes nos momentos alegres e difíceis, durante todo o tempo de convivência no dia a dia. A eles meu eterno carinho.

À amiga **Sandra Maria Quintela Souza Águia** (*in memoriam*), que tanto torceu para que eu “voasse” cada vez mais alto e agora infelizmente não se encontra mais aqui, para ver que consegui subir mais um degrau. Mas tenho a certeza que ela de algum lugar, continua a torcer.

Aos Profs. Drs. **Cícero Alexandre** e **José Theodorico Filho** que entraram em contato com os proprietários das fazendas, nas quais realizei parte deste trabalho.

As duas pessoas de grande importância neste trabalho **Ejário Pereira Terto** e o Sr. **Euclides Gomes da Silva**, pelo acolhimento e atenção dispensada para comigo durante os dias de coleta no seu local de trabalho.

Aos proprietários das fazendas onde realizei minhas coletas, que permitiram a utilização de seus animais e de seus recintos sem fazerem objeções.

Às amigas **Cícera** e D. **Gerusa** que sempre alegres estavam dispostas a deixar nosso local de trabalho limpo, com maior zelo e pelos cafés oferecidos nos dias em que eu chegava muito cedo a UFAL. A elas, meu eterno carinho e respeito.

Às amigas do Instituto de Química e Biotecnologia **Rejane Montenegro**, **Valéria** e **Zaira**, sempre amigas e dispostas a ajudar.

Às secretárias do RENORBIO do ponto focal Alagoas, **Ana Paula** e **Diana**, pela paciência e prontidão em resolver nossos problemas acadêmicos.

Às Profas. Dras. **Fabiane Caxico de Abreu**, **Lucia Conserva**, **Margarida Teodoro**, **Sônia Salgueiro** e ao **Prof. Dr. Josealdo Tonholo**, pela amizade e ajuda nas horas mais precisas, meu eterno respeito e gratidão.

Ao CNPq, a CAPES e à FAPEAL pelo auxílio financeiro, permitindo a realização do meu trabalho de tese e permitindo que percorresse fronteiras em busca de um saber científico que venha a promover bem estar aos animais, o que é meu dever como Zootecnista.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho.

Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.

Isaac Newton

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito dos Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) liberados por bovinos de diferentes raças sobre o comportamento da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*). Esse ectoparasita é de grande importância econômica, por causar diversos danos à pecuária mundial. O estudo teve início com a implantação de um criatório de moscas-dos-chifres em laboratório, na Universidade Federal de Alagoas, visando à realização de estudos avançados com esse parasita, assim como acompanhar o desenvolvimento ovo-adulto. Três criações foram utilizadas para obtenção de um maior número de emergência da mosca *H. irritans* em laboratório. Posteriormente, foram realizadas coletas de odores exalados por bovinos das raças Girolando, Holandesa, Pardo-Suíça, Nelore e Gir (de ambos os sexos), seguindo-se extração, por hexano bidestilado, do material coletado e análises por Cromatografia Gasosa (CG); Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) em todas as raças estudadas; Cromatografia Gasosa acoplada a Eletroantenografia (CG/EAG) com o cromatograma que apresentou o maior número de picos e bioensaios comportamentais. Os bioensaios comportamentais com a mosca-dos-chifres foram realizados com os extratos oriundos dos animais e com padrões sintéticos identificados no CG/EAG usando olfatômetro tipo Y. Além disso, foi investigado se existe diferença dos COVs liberados entre os diferentes grupos genéticos. Com relação ao criatório de mosca-dos-chifres, após emergência, as moscas foram contadas e o resultado foi de 18,61 % de emergência, na primeira criação. Na segunda criação, a porcentagem de moscas emergidas foi de 55,56 % e na terceira criação a emergência foi de 78,22 %, sendo considerado, o método mais adequado para criação de *H. irritans* em laboratório, quando a criação foi desenvolvida dentro de uma câmara de refrigeração. A análise dos resultados de CG da raça Pardo-Suíça revelou que a coleta dos COVs em animais foi eficiente já que a maior parte dos compostos repetiu-se em todas as amostras analisadas. A análise em CG de todas as raças mostra que não houve uma grande variação qualitativa com relação aos COVs das amostras analisadas. A análise do CG/EM, confirmou a diferença dos compostos entre as raças, sendo que, nove foram comuns em todas as raças. Entre eles, canfeno, 2-etil-hexanal, 2-heptenal, 1-octen-3-ona, 1-octen-3-ol, octan-3-ona, octanal, 2,2,8-trimetildecano e butirato de 2-feniletila. Todos os COVs obtidos nas análises citadas acima foram identificados através do Índice de Kóvats (KI). Os resultados obtidos com os bioensaios dos extratos da aeração mostraram que os insetos foram atraídos pelos voláteis de ambos os sexos das raças europeias e da mestiça Girolando. Os bioensaios realizados com os padrões sintéticos mostraram que apenas o acetato de butila apresentou respostas significativas nas concentrações de 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} mg/mL. Os COVs obtidos por CG/EM foram similares entre as raças europeias e a mestiça e por outro lado distintos das raças indianas.

Palavras-chaves: Bovinos. *Haematobia irritans*. Semioquímicos. Sanidade animal. Compostos orgânicos voláteis

ABSTRACT

The aim of this work was to study the effect of Volatile Organic Compounds (VOCs) released by cattle of different breeds on the behavior of the horn fly (*Haematobia irritans*). This ectoparasite is of great economic importance because it causes damage to various livestock worldwide. The study began with the implementation of a breeding place for horn flies in the laboratory at the Federal University of Alagoas in order to perform advanced studies with this parasite, as well as to follow the development of the egg to adult. Three breeding methods were used in order to obtain the greater emergency index of *H. irritans* fly in laboratory. Afterwards, odors released by cattle breeds Gyr, Holstein, Brown Swiss, Nellore and Gyr (both sexes) were taken followed by the extraction of the material collected with the aid of bidistilled hexane and analysis by Gas Chromatography (GC), Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS) in all breeds; Electroantennography Gas Chromatography (GC/EAG) performed with the chromatogram with the highest number of peaks and behavioral bioassays. The behavioral bioassays with the horn fly were performed with extracts from animal and synthetic standards identified in GC/EAD, using an olfactometer type Y. In addition, we investigated whether there are differences on VOCs released from the different genetic groups. With regard to the breeding place, in the first creation, horn flies after emergence were counted and the result was 18.61% of emergency. In the second creation, the percentage of emerged flies was 55.56% and in the third was 78.22%, considered, thus, the most appropriate method for rearing *H. irritans* in laboratory, when the development was within a cooling chamber. Analysis of the GC chromatograms of the Brown Swiss breed showed that the collection of VOCs in animals was efficient since most of the compounds was shown to be present in all samples. The qualitative GC analysis of all races had shown that there was not a large variation with respect to VOCs. The analysis of GC/MS confirmed the difference on compounds between the races, and nine of them were common in all races. Among them, camphene, 2-ethylhexanal, 2-heptenal, 1-octen-3-one, 1-octen-3-ol, octan-3-one, octanal, 2,2,8-trimethyldecane and 2-phenylethyl butyrate. All VOCs obtained in the analyses mentioned above were identified by their Kovats indices indexes (KI). The results of the extracts' aeration bioassays have shown that insects are attracted by volatiles from both sexes of the European breeds and mixed Girolando. In the bioassays performed with synthetic standards, only butyl acetate showed significant responses at concentrations of 10^{-7} , 10^{-6} and 10^{-5} mg/mL. VOCs obtained by GC/MS were similar between breeds and mixed European and otherwise distinct from the Indian races.

Keywords: Cattle. *Haematobia irritans*. Semiochemicals. Animal healthy. Volatile organic compounds

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Animal da raça Nelore	19
Figura 2 –	Animais da raça Gir	20
Figura 3 –	Animal da raça Pardo-Suíça	22
Figura 4 –	Animal da raça Holandesa	22
Figura 5 –	Animal da raça Girolando	23
Figura 6 –	<i>Haematobia irritans</i>	24
Figura 7 –	Ciclo evolutivo da mosca-dos-chifres	26
Figura 8A –	Coleta da mosca-dos-chifres no animal	35
Figura 8B –	Garrafa PET adaptada para o transporte das moscas	35
Figura 9A –	Gaiola telada, vista externa	36
Figura 9B –	Gaiola com vista interna	36
Figura 10 –	Distribuição dos potes em grupos contendo fezes frescas e ovos em papel de filtro	37
Figura 11 –	Potes dentro da gaiola entomológica	38
Figura 12 –	Gaiolas entomológicas com a distribuição dos potes com material biológico	39
Figura 13 –	Gaiola com material biológico armazenado em uma câmara climatizada	40
Figura 14 –	Coleta dos COVs no animal	43
Figura 15 –	Tubos coletores sobre o dorso do animal	43
Figura 16 –	Sistema para realização de bioensaios comportamentais com a mosca-dos-chifres	45
Figura 17 –	Cromatógrafo Gasoso (CG) 6890	46
Figura 18 –	Cromatógrafo Gasoso Acoplado a um Espectrômetro de Massa (CG/EM)	47
Figura 19 –	Ovos de mosca-dos-chifres individuais e em grupos	51
Figura 20 –	Mosca-dos-chifres no momento da postura	52
Figura 21A –	Larva de primeiro instar de <i>H. irritans</i>	52
Figura 21B –	Larva de terceiro instar de <i>H. irritans</i>	52
Figura 22 –	Pupa de <i>H. irritans</i>	53
Figura 23 –	Comparação dos perfis cromatográficos da raça Pardo-Suíça	56
Figura 24 –	Cromatograma da amostra do ambiente (branco)	56
Figura 25 –	Perfil cromatográfico dos COVs liberados por fêmeas e machos bovinos das raças Girolando, Holandesa, Pardo-Suíça, Nelore e Gir	58
Figura 26 –	Identificação de COVS comuns em fêmeas de cinco raças bovinas	66

Figura 27 –	Identificação de COVS comuns em machos de cinco raças bovinas	67
Figura 28 –	Identificação de COVS comuns apenas em fêmeas das raças indianas	68
Figura 29 –	Bioensaios comportamentais da mosca-dos-chifres com relação aos COVs de raças bovinas	69
Figura 30 –	Compostos voláteis que indicam atividade da <i>S. calcitrans</i>	72
Figura 31 –	Bioensaios comportamentais da <i>H. irritans</i> frente a padrões sintético	73
Figura 32 –	Dendrograma representativo da similaridade entre raças de bovinos considerando os voláteis liberados por machos	76
Figura 33 –	Dendrograma representativo da similaridade entre raças de bovinos considerando os voláteis liberados por fêmeas	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Regime alimentar e manejo sanitário dos animais e município de coleta das moscas-dos-chifres nas fazendas envolvidas nesta pesquisa	34
Tabela 2 –	Valores médio, máximo e mínimo de viabilidade (%) de emergência de moscas-dos-chifres nas três criações	55
Tabela 3 –	Compostos Orgânicos Voláteis identificados por CG/EM, em amostras de raças de bovinos	61
Tabela 4 –	Variação no número de compostos orgânicos voláteis liberados por fêmeas de cinco raças de bovinos e percentuais em relação a sua origem	75
Tabela 5 –	Variação no número de compostos orgânicos voláteis liberados por machos de cinco raças de bovinos e percentuais em relação a sua origem	75
Tabela 6 –	Agrupamento estabelecido pelo método de Tocher entre cinco raças de bovinos avaliados para 18 compostos orgânicos voláteis emitidos por indivíduos machos	76
Tabela 7 –	Agrupamento estabelecido pelo método de Tocher entre cinco raças de bovinos avaliados para 15 compostos orgânicos voláteis emitidos por indivíduos fêmeas	76
Tabela 8 –	Contribuição (%) das variáveis para diferenciação das raças (machos)	77
Tabela 9 –	Contribuição (%) das variáveis para diferenciação das raças (fêmeas)	77

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	O Zebu	18
2.2	O gado Europeu	20
2.3	O gado Girolando	23
2.4	A mosca-dos-chifres (<i>Haematobia irritans</i>)	24
2.4.1	Ciclo evolutivo da mosca-dos-chifres	25
2.4.2	Impacto econômico da infestação de mosca-dos-chifres em bovinos	26
2.4.3	Métodos de combate à infestação por mosca-dos-chifres	28
2.5	Semioquímicos	29
2.6	Extração de semioquímicos através de aeração	30
2.7	Identificação dos Compostos Orgânicos Voláteis (COVs)	30
2.8	Bioensaios comportamentais	32
2.9	Aparelho de olfatometria	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	Geral	33
3.2	Específico	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Coleta do material biológico	34
4.2	Protocolo de criação da mosca-dos-chifres em laboratório	35
4.2.1	Primeira criação	36
4.2.2	Segunda criação	37
4.2.3	Terceira criação	39
4.3	Coletas dos COVs e análises cromatográficas	40
4.3.1	Preparação do tubo coletor com os adsorventes	40
4.3.2	Coleta dos COVs nos animais da raça Pardo-Suíça	40
4.3.3	Extração em laboratório do material coletado nos animais	41
4.3.4	Análise em Cromatógrafo Gasoso das amostras coletadas em bovinos da raça Pardo-Suíça	41
4.4	Coleta de COVs de bovinos de diferentes raças	42
4.5	Bioensaios comportamentais em olfatômetro do tipo Y com COVs oriundos dos animais	44
4.6	Análise em Cromatógrafo Gasoso (CG) das amostras coletadas em diferentes raças bovinas	46
4.7	Análise em Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrômetro de Massa (CG/EM) das amostras coletadas em diferentes raças bovinas	47
4.8	Teste de atividade em Cromatografia Gasosa/Eletroantenografia - CG/EAG	48

4.9	Bioensaios comportamentais em olfâmetro do tipo Y com compostos padrões detectados no CG/EAG	48
4.10	Análise Estatística da diferença dos COVs entre as raças estudadas	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	Protocolo de criação da mosca-dos-chifres em laboratório	51
5.1.1	Primeira criação	53
5.1.2	Segunda criação	54
5.1.3	Terceira criação	54
5.2	Eficiência da metodologia da coleta de COVs em bovinos	55
5.3	Identificação dos COVs das amostras dos animais em CG	57
5.4	Análise das amostras de extração de COVs oriundos de bovinos por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas	60
5.5	Bioensaios comportamentais com moscas-dos-chifres	69
5.6	Análise de CG/EAG (realizado na Inglaterra) do extrato da raça Girolando fêmea frente a <i>S. calcitrans</i>	71
5.7	Bioensaios comportamentais com moscas-dos-chifres frente aos compostos no CG/EAG	72
5.8	Diferenças dos COVs entre os grupos genéticos estudados	74
6	CONCLUSÕES	79
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	80
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICES	89

1 INTRODUÇÃO

O homem pré-histórico em sua convivência com os animais passou a observá-los e constatou que poderia empregá-los em seu benefício, tanto como vigia, quanto na caça, no caso do cão, o qual se tornou o primeiro animal a ser domesticado. Após algum tempo, outros animais foram também domesticados, como os caprinos e os bovinos (DOMINGUES, 1968).

Junto à domesticação surgiram as moléstias causadas por microrganismos e parasitas animais. Dentre esses parasitas, podemos destacar a mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae), que com o passar do tempo foi se disseminando mundialmente e hoje se encontra em lugares mais diversos como o Japão, Estados Unidos da América, Canadá, e em alguns países da América Central, da Europa e da América do Sul, incluindo o Brasil (KURAMOCHI, 2000; CUPP et al., 2010; MOCHI et al., 2010). No Brasil, ela foi detectada pela primeira vez, na década de 70 no Estado de Roraima e nos anos 90, já se encontrava em todo o país (OLIVEIRA et al., 2006; ALMEIDA et al., 2010).

A mosca-dos-chifres tem como hospedeiro principal o bovino, porém tende a parasitar outros animais, como: equinos, ovinos, cães, e raramente ataca os humanos (MARKIN & YOSHIOKA, 1998; ANGEL-SAHAGÚN et al., 2005). Este díptero hematófago tem hábito alimentar frequente por períodos curtos de tempo, repetidas vezes durante o dia (UNTALAN et al., 2006). Sua ação de sugar o sangue do animal causa danos significativos à pecuária, afetando a produção do animal e também o aproveitamento do couro (QUIROZ, 1984; LYSYK & STEELMAN, 2004; JENSEN et al., 2004; BAUTISTA et al., 2004).

O gado, ao receber a picada da mosca-dos-chifres, se irrita e passa a se estressar constantemente. Assim, o tempo destinado à alimentação é reduzido, interferindo na digestão e absorção dos nutrientes e suplementos alimentares. O estresse proporciona maior gasto de energia por parte do animal, influenciando negativamente na produção de leite e de carne (CRUZ-VÁZQUEZ et al., 2000). A picada também causa dermatite, tornando o couro fraco e reduzindo seu valor comercial, servindo de acesso para que outros patógenos penetrem no animal, causando doenças como: carbúnculo hemático, leucose e anaplasiose. Além disso, transporta os ovos de *Dermatobia hominis*, outro díptero que causa o berne (GOMES et al., 1998; EDWARDS et al., 2000).

O controle desse ectoparasita é feito à base de inseticidas químicos sintéticos nas aplicações em “sprays”, banhos, brincos, entre outros. Vários estudos revelaram que há desenvolvimento de resistência a esses produtos, devido ao uso indiscriminado e de forma incorreta (BAUTISTA, 2004; OLIVEIRA et al., 2006; TORRES et al., 2011). As implicações futuras devido aos resíduos dos produtos podem ser drásticas ao meio ambiente, aos humanos e aos próprios animais. Sendo assim, novos métodos de controle precisam ser desenvolvidos.

O estudo de semioquímicos (sinais químicos) como forma alternativa no controle de pragas tem despertado grande interesse na comunidade científica, por proporcionar diversas vantagens, dentre as quais: simplicidade, economia e um menor impacto ambiental (NAVARRO et al., 2002). Esse estudo tem possibilitado a descoberta de voláteis para utilização no manejo de insetos-praga, sendo possível a identificação das moléculas de odores atraentes envolvidas na comunicação olfativa (MOREIRA et al., 2005; CERUTI, 2007).

De acordo com Sbarbati & Osculati (2006), os semioquímicos compreendem dois grupos: feromônios e aleloquímicos. Os feromônios são compostos que intermedeiam a comunicação entre indivíduos da mesma espécie e os aleloquímicos, a comunicação entre indivíduos de espécies diferentes. Esses autores ainda revelam que os semioquímicos têm sido estudados associados às plantas e invertebrados, com foco em agricultura e o controle dos parasitas. Já, para os estudos com vertebrados, há muitas informações relatadas com feromônios, porém poucos dados com relação aos aleloquímicos.

O uso de semioquímicos para o controle de ectoparasitas de animais ainda é escasso. Assim, existe a necessidade de estudos que resultem, no futuro, em novas técnicas para controlar o ectoparasitismo existente no mundo animal, contribuindo para a pecuária mundial, principalmente para a bovinocultura brasileira, que se destaca como o maior produtor de bovino comercial do mundo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A domesticação dos animais vertebrados pelo homem surgiu, deliberadamente, por diversas razões, dentre elas a necessidade de alimentação, tendo como fonte: coelho, bode, porco e o boi (DELARIVA & AGOSTINHO, 1999).

Todo gado domesticado pertence à família dos bovídeos, subfamília Bovinae e pode ser classificado em *Bos taurus*, conhecido como gado europeu, de clima temperado, e *Bos indicus*, denominado de Zebu, de clima tropical. Embora, proveniente dos trópicos, o gado Zebu e o gado Europeu de regiões temperadas são originados de um ancestral comum, que foi domesticado na Ásia Ocidental, a cerca de 4500 aC, eles diferem em relação às características morfofisiológicas, provavelmente devido à adaptação a duas diferentes regiões climáticas (ABEYGUNAWARDENA & DEMATAWEWA, 2004).

Na década de 40, objetivando-se a obtenção de animais produtivos e adaptados aos trópicos foram desenvolvidas as raças sintéticas. Essas raças, geralmente, apresentavam proporção genotípica de 5/8 de gado europeu e 3/8 do gado zebu, conferindo ao animal a produtividade da primeira e adaptabilidade da segunda. A raça Girolanda foi uma dessas raças criadas na época, e atualmente se apresenta com várias composições genotípicas (1/2, 3/4, 5/8 e 7/8). Caracteriza-se pela rusticidade e adaptabilidade do Gir e produtividade do Holandês. Atualmente, segundo Silva et al., (2011), cerca de 80 % do leite produzido no Brasil é proveniente do gado Girolando.

2.1 O Zebu

O Zebu (*Bos indicus*) é conhecido como gado indiano, gado da Índia, entre outras denominações, é de origem asiática, tendo sido introduzido na África, nas Américas Central e do Sul e na Austrália (ABEYGUNAWARDENA & DEMATAWEWA, 2004).

No Brasil, houve registros do gado zebuíno no século XX, nos estados da Bahia, Pernambuco e Rio de Janeiro, espalhando-se para o Brasil Central (MARQUES et al., 1981). Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ, 2010), o País possui hoje várias raças zebuínas, dentre elas: a Gir, Nelore, Indubrasil, Tabapuã, Brahman, Sindi e Caigaian, além da Guzerá. Todas elas são identificadas pela presença de uma gibba ou cupim, no dorso do animal.

Dentre todas as raças zebuínas, a Nelore (**Figura 1**) é a principal, correspondendo a 80% do rebanho brasileiro, com mais de 100 milhões de cabeças (SARTORI & BARROS, 2011). Esse quadro contribui para que o Brasil tenha o maior rebanho comercial do mundo (VALLE, 2011).

Figura 1 – Animal da raça Nelore



Fonte: Autor da tese, 2010.

O gado Gir (**Figura 2**, pág. 20), quando introduzido no Brasil, tinha sua utilização na produção de carne. No entanto, em 1930, deu-se início à exploração dessa raça pela aptidão leiteira através de instituições públicas em conjunto com criadores, originando assim em 1985, o Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro, executado pela Embrapa Gado de Leite e a Associação Brasileira dos Criadores de Gir Leiteiro (ABCGIL). Esse programa contempla ações na área reprodutiva, em que a raça se destaca como líder no mercado de sêmen (FARIA et al., 2006; REIS FILHO, 2006).

Figura 2 – Animais da raça Gir



Fonte: SANT'ANA, 2012.

Animais azebuados são rústicos, férteis, prolíferos, com excelente adaptação às condições tropicais, apresentando resistência ao calor, possuem excelente habilidade materna, precocidade reprodutiva, boa conformação de carcaça, maior produção de carne em menor tempo, são resistentes a doenças e a ectoparasitas, principalmente ao carrapato (GONZALES, 2003).

2.2 O gado Europeu

O *Bos taurus*, de origem europeia, é denominado como gado europeu, boi europeu, dentre outros e faz parte da maior produção de leite do mundo (LENSTRA, 2006).

Segundo a FAO (2009), a produção de leite mundial é de 583.401.740 ton/ano, e os cinco maiores países produtores são: Estados Unidos da América, Índia, China, Rússia e Brasil. Recentemente o Brasil contava com uma produção de 29,112 bilhões de litros de leite (IBGE, 2009).

O bovino é bastante útil em alguns setores, como por exemplo: na agricultura, puxando arado; como meio de transporte, em algumas cidades do interior do Brasil; no esporte, como

vaquejada e rodeio; nas tecnologias de ponta, como transferência de embrião e na inseminação artificial; na produção de leite e carne, neste caso produz mais leite que carne. Os derivados da carne e do leite são industrializados e comercializados no mundo todo; seus chifres e couro são usados na indústria e no artesanato; seus ossos são aproveitados na elaboração de farinha. A farinha é usada para suprir a deficiência na alimentação animal e no melhoramento genético, onde se estuda o melhoramento de raças que produzam maior ganho de peso, em menor tempo. Enfim, o boi é considerado uma máquina produtiva, onde nada é desperdiçado.

Existem, hoje, diversas raças europeias de gado, destacando-se: a Jersey, a Pardo-Suíça, a Simental, a Charolesa, a Hereford e a Holandesa. Dentre as raças disseminadas no Brasil, a Holandesa é a mais preconizada devido ao seu potencial genético na produção de leite, além disso, é o gado que se destaca nos cruzamentos com outras raças, por apresentar maiores qualidades na produção (MCMANUS et al., 2008). Sua maior concorrente é a Pardo-Suíça que possui aptidão para carne, leite e também serve como animal de tração. Porém, a mais empregada é a aptidão leiteira. A Pardo-Suíça (**Figura 3**, pág. 22) apenas leva vantagem sobre a Holandesa (**Figura 4**, pág. 22) pelo maior aproveitamento dos reprodutores machos no cruzamento entre raças (ALMEIDA et al., 2003).

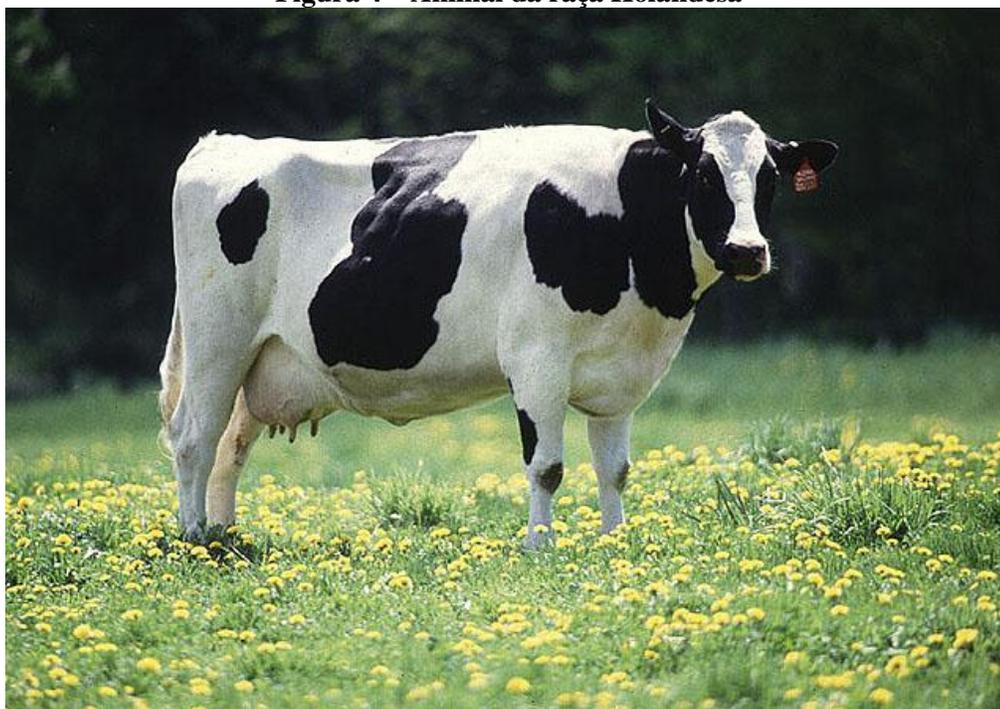
Os animais da raça europeia quando bem manejados atingem a puberdade precocemente e, conseqüentemente, estão aptos à reprodução. Apresentam alta produção de leite e grande precocidade no ganho de peso (SARTORI, 2007). Todavia, são animais pouco adaptados à temperatura mais elevada e de pouca rusticidade. Em geral, são animais mais susceptíveis às doenças e infestação por ectoparasitas (MORRIS, 2007).

Figura 3 – Animal da raça Pardo-Suíça



Fonte: Autor da tese, 2010.

Figura 4 – Animal da raça Holandesa



Fonte: <http://www.infoescola.com/pecuaria/gado-holandes>

2.3 O gado Girolando

Segundo ditos populares, essa raça, oriunda de cruzamento surgiu por um acaso quando um touro Gir cobriu uma vaca Holandesa, e se observou que o produto desse cruzamento possuía boas características de: produtividade, fertilidade e vigor. Assim, a prática de cruzamento para produção de leite passou a ser explorada por pesquisadores que objetivavam melhoria na qualidade dos produtos (SILVA et al., 2011).

Apesar de a raça Girolando (**Figura 5**) existir desde 1940, ela só foi oficializada, em 1996, com a fundação da Associação Brasileira dos Criadores de Girolando, na cidade de Uberaba, Minas Gerais. Hoje, essa raça já está bastante difundida, chegando a mais de um milhão de animais certificados. E ela foi introduzida na República de Benin, no continente africano, para melhorar a produção leiteira (SILVA et al., 2011; ALKOIRET et al., 2011).

Figura 5 – Animal da raça Girolando



Fonte: <http://www.argen.com.br/historiaracas.asp?raca=34>

2.4 A mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*)

OS bovinos são afetados economicamente por ectoparasitas, proporcionando baixo rendimento e alto custo na produção. Os ectoparasitas mais prejudiciais ao gado citados na literatura são: o carrapato bovino (*Ripicephalus (Boophilus) microplus*), a mosca-do-berne (*Dermatobia hominis*), a mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) e a mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) (MARQUES et al., 2000; GOMES et al., 2008; SILVA et al., 2010; TANGTRAKULWANICH et al., 2011).

A *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (**Figura 6**), pertence ao reino animal, ao filo dos artrópodes, à classe dos insetos, à ordem díptera e à família Muscidae. É conhecida popularmente como mosca-dos-chifres e tem como hospedeiro preferencial os bovinos (CASTIGLIONI & BICUDO, 2005). Entretanto, em época de grande infestação no campo ou na ausência deste animal, a mosca ataca outras espécies, como os ovinos e os equinos (ALMEIDA et al., 2010).

Figura 6 – *Haematobia irritans*



Fonte: <http://entomology.unl.edu/images/muscidflies/hornfly1.jpg>

Esse inseto é de pequeno porte, medindo entre 2 a 5 mm de comprimento. Fêmeas e machos possuem obrigatoriamente ação hematófaga na fase adulta, tem o hábito de ficar com a cabeça voltada para o solo, permanecem 24 horas no corpo do animal, deixando-o apenas para ovipositar em fezes frescas (HARGET & GOULDING, 1962; SILVA NETTO et al., 1991).

Preferencialmente, permanecem nas regiões dos chifres, cervical e dorso-lombar e em animais de raças zebuínas, no cupim, deslocando-se para a região ventral do animal nos horários de sol forte (BRITO et al., 2005; CASTIGLIONI & BICUDO, 2005). Todo o corpo do animal pode ser afetado, sendo que a permanência maior será na região em que a cauda e a cabeça não possam alcançar (CAMPOS et al., 2008).

Normalmente, a *H. irritans* tem preferência por animais de pelagem escura, de raças europeias ou mestiços e machos adultos. Essa prioridade está relacionada com as características apresentadas pelos touros que têm menor mobilidade e sensibilidade, associados a fatores hormonais, como a concentração de testosterona (BRITO et al., 2005; CAMPOS et al., 2008).

2.4.1 Ciclo evolutivo da mosca-do-chifres

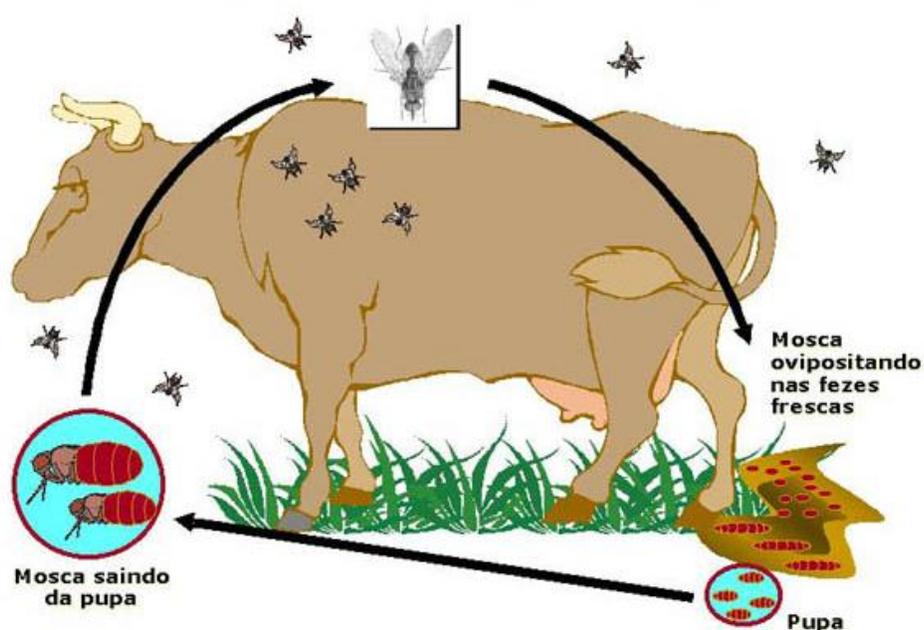
Inseto de ciclo de vida (**Figura 7**, pág. 26) curto, a mosca-dos-chifres passa toda sua vida adulta sobre o animal, como fonte de alimentação (LIMA et al., 2010). Quando se encontram completamente ingurgitadas de sangue, as fêmeas deixam o hospedeiro para depositar seus ovos, que chegam a medir cerca de 1,20 mm de comprimento e 0,32 mm de largura. Os ovos são colocados nas bordas da massa fecal recém-defecada pelo gado, podendo colocar cerca de 20 ovos por postura, chegando a ovipositar até 15 vezes durante toda sua vida (BRITO et al., 2005).

As posturas podem ser realizadas durante o dia ou à noite. Após 24 horas da postura, ocorre a eclosão dos ovos que se transformam em larvas. Nessa etapa, passam por três instares, por um período de 3 a 5 dias. As larvas de primeiro instar medem em média 1,5 mm de comprimento e 0,25 mm de largura, elas entram profundamente na massa fecal com o intuito de se proteger dos raios solares, permanecendo nesse estágio cerca de 10 horas, quando passam para o segundo instar apresentando 5,4 mm de comprimento e 0,6 mm de largura, e depois de 18 horas, em média, chegam ao terceiro instar quando medem aproximadamente 7 mm de comprimento e 1 mm de largura. As larvas migram para as partes mais úmidas do bolo fecal, à medida que vai ocorrendo a dessecação deste. Em seguida, o terceiro instar larval passa à fase de pupa, que mede aproximadamente 3,3 mm de comprimento por 1,4 mm de largura. Caso o solo venha se encontrar excessivamente seco, as pupas podem ser encontradas no meio do bolo fecal. Quando as fezes estiverem mais secas que o solo, as pupas se abrigam no solo, até 3,8 cm de

profundidade, permanecendo aí de 5 a 6 dias, quando emergem os adultos (BRUCE, 1964; BRITO et al., 2005; ALMEIDA et al., 2010).

O inseto adulto apresenta movimentos lentos e coloração escura, e vão à superfície das fezes ou para a vegetação, onde permanecem por aproximadamente 1 hora com a cabeça voltada para baixo (geotropismo positivo) e estendem suas asas, para daí partirem em busca do hospedeiro. A cópula ocorre sobre o hospedeiro ou na vegetação ao redor do hospedeiro a partir do segundo dia de vida. A postura dos ovos ocorre a partir do terceiro dia da emergência das fêmeas (BRITO et al., 2005).

Figura 7 – Ciclo evolutivo da mosca-dos-chifres



Fonte: http://www.msd-saude-animal.com.br/doencas/mosca_dos_chifres/ciclo_evolutivo.aspx

2.4.2 Impacto econômico da infestação de mosca-dos-chifres em bovinos

O parasitismo da mosca-dos-chifres deve-se ao grande número de indivíduos que frequentemente se encontram no animal, causando assim diversos danos à pecuária. Ela tem por hábito alimentar-se de sangue e para tal, insere e retira a probóscide rígida diversas vezes no couro do animal. A fêmea pica mais que o macho pela necessidade de maturar seus ovos. O repasto pode ser realizado até 40 vezes por dia pela fêmea e 25 vezes pelo macho, podendo durar

de três a quatro minutos (BRITO et al., 2005). Segundo Jonsson & Mayer (1999) uma infestação moderada de *H. irritans exigua* (mosca-do-búfalo), cerca de 200 mosca/animal, causa perdas de 520 mL de leite e 28 g de peso vivo diariamente.

Os bovinos altamente parasitados pela mosca-dos-chifres sofrem grandes problemas de saúde pela perda de sangue, por aquisição de moléstias e irritação, com conseqüente redução da produção de leite e de ganho de peso. Essa condição faz com que o animal fique propenso a infecções causadas por organismos oportunistas, além do mais causa perda irreparável no couro (CRUZ-VÁZQUEZ et al., 1999). Quando o animal sofre ataque das moscas-dos-chifres fica estressado na tentativa de se livrar delas e, em conseqüência, acarreta gasto de energia e diminuição do tempo de pastejo e de ingestão de água (BIANCHI & ALVES, 2002).

A picada dolorosa da mosca-do-chifres é considerada como a maior causa de prejuízo para os animais, por causar pruridos, irritação subcutânea e lesões provocadas pelas cabeçadas. O elevado nível de estresse pode acarretar ainda acidentes devido aos agrupamentos de animais. Além disso, as picadas promovem danos à pele, sendo fator relevante para a indústria de couros, calçados, dentre outros (FAZOLIN et al., 1997; PINHEIRO et al., 2001).

Cerca de 40% das lesões apresentadas no couro do animal são causadas por ectoparasitas. A mosca-dos-chifres age diretamente atacando em diversas partes, causando numerosas lesões. O couro com lesões passa por um processo de maquiagem, onerando a produção e deixando-o com qualidade inferior (PEREIRA et al., 2005). Ela também age indiretamente, sendo o vetor da *Dermatobia hominis*, mosca-do-berne (LEITE et al., 1998). Por ser um díptero menor, ela é capturada pela mosca-do-berne e em seu abdômen são fixados os ovos desta e com uma ou duas semanas, os ovos se transformam em larvas. Ao pousar no animal de sangue quente para fazer o repasto, as larvas descem do abdômen da mosca-dos-chifres e adentram nos orifícios originados no couro do hospedeiro.

A *H. irritans* causa prejuízos estimados em milhões de dólares aos países criadores de bovinos. Bianchin et al., (2006) estimaram que o Brasil sofreu perdas econômicas de US\$ 865 milhões/ano. Para amenizar essas perdas econômicas, normalmente os criadores de bovinos utilizam inseticidas para o controle desse ectoparasita.

2.4.3 Métodos de combate à infestação por mosca-dos-chifres

Pesquisadores vêm buscando alguma forma para inibir ou impedir a ação deletéria provocada por *H. irritans*. Entre os métodos utilizados, destacam-se banhos “pour-on” com mosquicidas, brincos a base de produtos sintéticos, tratamentos com controles biológicos, dentre outros. Esses meios de controle quando bem aplicados, diminuem as infestações do ectoparasito. Contudo, a médio prazo é preciso mudar a substância aplicada, devido à rápida resistência demonstrada por *H. irritans* aos princípios ativos utilizados.

A resistência desenvolvida pela mosca-dos-chifres aos produtos sintéticos em diversos países é relatada por Oyarzún et al. (2011), sendo os Estados Unidos da América e a Austrália os primeiros a registrarem a resistência das moscas aos organofosfatos e piretróides. Essa resistência teve continuidade com a propagação da mosca para as Américas Central e do Sul, afetando países como o México, a Argentina e o Brasil.

Os inseticidas agem de forma diferente sobre o inseto. No caso dos organofosfatos possuem ação no sistema neurotransmissor, inativando a enzima acetilcolinesterase, envolvida na regulação da transmissão nervosa. Já os piretróides agem nos insetos com rapidez causando paralisia imediata e mortalidade, efeito de choque denominado “Knock down”. Estes compostos são modelos sintéticos das piretrinas, obtidas das flores da espécie de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e apresentam grande instabilidade à luz solar e ao ar, o que os tornam menos eficazes no controle das pragas (SANTOS et al., 2007; OYARZÚN et al., 2008). A resistência aos inseticidas depende de vários fatores, dentre eles a biologia genética e o comportamento da mosca e o uso incorreto na aplicação dos inseticidas. Além da resistência, a aplicação indevida pode causar danos ao meio ambiente. Segundo Spicer & Kereu (1993), o uso de produtos sintéticos, tais como inseticidas e acaricidas afetam o meio ambiente e também causam grandes problemas à saúde pública. Como exemplo, podem ser citados os registros em mulheres lactantes da Nova Guiné, as quais apresentavam considerável concentração de diclorodifeniltricloroetano (DDT), em suas glândulas mamárias. A intoxicação aguda por DDT em seres humanos pode causar sintomas como: dor de cabeça, tonturas, convulsões, insuficiência respiratória e até a morte, dependendo da dose e do tempo de exposição (D’AMATO et al., 2002).

Diante de tais fatos e dos prejuízos acarretados ao meio ambiente, causando grandes impactos socioeconômicos e ambientais, a ciência está indo em busca de métodos alternativos no

controle de pragas. Um dos métodos que está sendo muito utilizado no controle de pragas é a utilização de semioquímicos.

2.5 Semioquímicos

Os semioquímicos são meios de comunicação através de sinais químicos emitidos entre as espécies, o que modifica o comportamento do indivíduo que os recebem. A antena dos insetos e artrópodes é o órgão responsável pela detecção e transmissão dos estímulos olfativos e mecânicos.

Os sinais podem ser intraespecíficos, comunicação entre a mesma espécie, denominados feromônios os quais têm a função de localizar alimentos ou parceiros para acasalamento, alertar a presença dos inimigos, marcar território, trilhar caminhos e dispersar. Podem também ser interespecíficos, com comunicação entre espécies diferentes, denominados aleloquímicos (FERREIRA et al., 2001; LEROY et al., 2011).

Os aleloquímicos compreendem os alomônios, cairomônios e os sinomônios. Os alomônios são sinais emitidos por uma espécie em seu próprio benefício, os cairomônios são sinais emitidos por um indivíduo que irão beneficiar apenas o receptor e os sinomônios são sinais que irão beneficiar tanto o emissor quanto o receptor (S BARBATI & OSCULATI, 2006).

Dentre os aleloquímicos, os cairomônios são liberados pelos hospedeiros e detectados pelos indivíduos receptores através de suas antenas e palpos, os quais indicam a fonte de alimento e provocam reações de comportamentos nos receptores. Alguns dípteros hematófagos, como o mosquito da dengue, os flebotomíneos, a mosca-do-estábulo, o mosquito da malária, a mosca-dos-chifres dentre outros, se beneficiam com os compostos orgânicos voláteis (COVs), que são os sinais químicos liberados pelos seus hospedeiros vertebrados (SCHOFIELD & BRADY, 1997; ANDRADE, 2006; LOGAN & BIRKETT, 2007).

O odor do hospedeiro possui um papel importante para os parasitas, facilitando assim a sua localização. Vários estudos elucidaram o papel de semioquímicos voláteis, incluindo aqueles envolvidos no processo de identificação de um hospedeiro adequado não somente de uma variedade de diferentes espécies, mas também dentro de um grupo de animais de uma mesma espécie (TORR & MANGWIRO 2000, BIRKETT et al. 2004, TORR et al. 2006, LOGAN &

BIRKETT 2007). Estudos realizados por Gikonyo et al. (2002 e 2003) mostraram que a mosca Tsé-Tsé (*Glossina spp.*) discrimina os odores de bovinos (hospedeiro) dos de antílopes.

Os insetos utilizam esses sinais em busca dos seus hospedeiros em sua maior parte como fonte de alimento, essa comunicação pode ser denominada de cairomônios que são encontrados em diversas partes dos vertebrados, como: na respiração, na pele, nas secreções glandulares, nas fezes e na urina (LOGAN & BIRKETT, 2007), onde geralmente a aeração é a metodologia mais utilizada para coleta de semioquímicos (MORAES et al., 2003).

2.6 Extração de semioquímicos através de aeração

A aeração permite a coleta de voláteis exalados pelo emissor que são transportados por um fluxo de ar constante e adsorvidos por polímeros especiais.

O sistema de aeração geralmente é de vidro e os compostos obtidos durante esse processo são adsorvidos em polímeros sólidos, como porapak, tenax ou super Q, carvão ativado, entre outros. Para a dessorção do material colhido são utilizados solventes como: diclorometano, hexano e éter com um alto grau de pureza, devido à sua volatilidade, o que permite a conservação dos compostos durante a evaporação (ZARBIN et al., 1999; MORAES et al., 2003).

Após a etapa de dessorção, é realizada a concentração do extrato, na qual normalmente é utilizado um gás inerte como o nitrogênio e em sequência faz-se a identificação dos compostos existentes nas amostras biológicas recolhidas de seus hospedeiros.

2.7 Identificação dos Compostos Orgânicos Voláteis (COVs)

A identificação dos COVs ocorre normalmente pelo uso de técnicas cromatográficas, através de análise das amostras que são realizadas por equipamentos como: o Cromatógrafo a Gás acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG/EM); Cromatógrafo à Gás acoplado a um Detector Eletroantegráfico (CG/EAG) e Microextração em Fase-Sólida (MEFS) ou Solid-Phase Microextraction (SPME). Esses equipamentos dão as informações sobre os compostos, analisam a qualidade do material injetado, produzindo uma lista de substâncias envolvidas e sua composição em associação com a determinação do índice de retenção (Kovats) e determina dentre eles, quais são os biologicamente ativos (ZARBIN et al., 1999; BRATTOLI et al., 2011).

O índice de retenção (IR) ou índice de Kovats (IK) de um dado composto é um número indicando sua retenção relativa comparada à de alcanos adjacentes (MORAES et al., 2011). O índice pode ser calculado pela seguinte equação:

$$IK = 100 * n + 100 * \frac{TR_x - TR_n}{TR_N - TR_n}$$

onde TR_x é o tempo de retenção do analito; TR_N , o tempo de retenção do alcano mais próximo após o analito; TR_n e n são, respectivamente, o tempo de retenção e o número de carbonos do alcano mais próximo antes do analito. Esses índices podem ser comparados com a biblioteca existente no equipamento ou pelos bancos de dados (Pherobase, www.kovats, Nistwebook)

No processo de cromatografia gasosa, são utilizadas amostras gasosas ou que podem ser volatilizadas, de modo que ocorra a separação e a análise de misturas. Nesse método, a amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás adequado denominado de Fase Móvel (FM) ou gás de arraste (AUGUSTO, 2000).

Já a cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massas, apresenta-se em duas fases. A primeira, cromatografia gasosa, separa os componentes de misturas complexas e a segunda, espectrometria de massas, fornece dados das estruturas das substâncias. Esta técnica separa e analisa praticamente todos os COVs, fazendo a seleção por uma coluna capilar (NASCIMENTO & SANT'ANA, 2001).

Na cromatografia gasosa acoplada ao eletroanténógrafo, a amostra quando injetada em um cromatógrafo gasoso, é dividida e ao mesmo tempo enviada para um detector de ionização de chama (DIC) e ao EAG. Esta técnica permite localizar a atividade eletrofisiológica dos compostos voláteis existentes nas amostras através da antena do inseto (MORAES et al., 2008).

A atividade biológica dos compostos orgânicos voláteis detectados nas técnicas cromatográficas é investigada por meios de ensaios comportamentais, utilizando olfatômetros e túnel de vento.

2.8 Bioensaios comportamentais

Os bioensaios comportamentais têm como objetivo quantificar e qualificar a resposta motora dos insetos frente a uma fonte de estímulo. Para quantificar é utilizado o número de vezes em que o inseto correspondeu à emissão de um determinado odor e, para qualificar, são observadas as atividades comportamentais associadas à percepção da fonte de odor.

Na maioria das vezes, os insetos mostram comportamentos como movimentação das antenas eretas em forma de V; elevação do pronoto e vibração das asas. O comportamento de busca irá depender da bioatividade do estímulo, o inseto pode voar ou mesmo caminhar em direção à fonte (EIRAS & MAFRA NETO, 2001).

Em bioensaios laboratoriais, duas técnicas são usadas para avaliar o comportamento do inseto em busca do estímulo olfativo, que são o túnel de vento e a olfatometria.

Nos bioensaios usando a olfatometria, a arena normalmente é bifurcada, e o inseto pode escolher entre o controle ou o tratamento. Neste ensaio, deve-se sempre analisar: a idade do inseto, se os dois sexos respondem ao estímulo ou apenas um, a temperatura ambiente, assim como também, a umidade relativa do ar, horário da avaliação, luminosidade, dentre outros fatores os quais podem causar interferência no comportamento do inseto (SANT'ANA & STEIN, 2001).

2.9 Aparelho de olfatometria

Dentre os aparelhos de olfatometria utilizados para a realização dos testes comportamentais dos insetos, destaca-se o olfatômetro em Y que foi desenvolvido por Barrows (1907), que consiste de tubo geralmente de vidro e é utilizado no sentido horizontal e a corrente de ar pode ser produzida por uma bomba de ar comprimido ou por sucção a vácuo. O objetivo da bomba é controlar a temperatura e a umidade do ar, purificando o ar antes dele entrar no olfatômetro. O ar pode ser purificado por meio de um filtro de carvão ativo no início dos braços menores. O estímulo olfativo é colocado no final de um braço menor (bifurcação) e o controle no outro braço também menor. Para dar início ao teste comportamental o inseto deve ser liberado no braço maior e sua resposta final será quando ele optar para um dos braços menores contendo o controle ou a fonte estimulante (EIRAS & MAFRA NETO, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

- Identificar os compostos orgânicos voláteis liberados por bovinos de diferentes raças que possam atrair a mosca-dos-chifres para o animal, comportamento evidenciado através da sua atividade em bioensaios.

3.2 Específico:

- Desenvolver protocolo de criação da mosca-dos-chifres em laboratório;
- Testar a eficiência da metodologia de coleta de compostos orgânicos voláteis em bovinos;
- Coletar substâncias voláteis presentes no corpo dos bovinos que atuam no comportamento da mosca-dos-chifres;
- Analisar as amostras colhidas dos animais por Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG/EM);
- Testar a atividade dos compostos orgânicos voláteis em olfatômetro;
- Verificar a atividade dos compostos orgânicos voláteis usando Cromatografia Gasosa/Eletoantenografia (CG/EAG);
- Realizar bioensaios de olfatomia com os compostos sintéticos estimulantes detectados no CG/EAG;
- Verificar a existência de diferenças entre os compostos orgânicos voláteis liberados de acordo com cada raça bovina em estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material biológico

Em condições de campo foram realizadas coletas de moscas-dos-chifres e de fezes bovinas, em três propriedades particulares, sendo duas delas situadas no Município de Satuba e uma no Município de Maceió, todas no Estado de Alagoas.

Os animais eram mestiços, com diferentes proporções de genótipos europeus, submetidos ao sistema semi-intensivo de produção: pasto e oferta de suplementação no cocho. Cada propriedade possuía distintas condições de manejo nutricional e sanitário. Em duas propriedades foram utilizados inseticidas, com diferentes princípios ativos, para o combate da mosca-dos-chifres em diferentes épocas de aplicação.

Os produtos utilizados continham os seguintes princípios ativos: diflubenzuron e diazinon. A segunda fazenda não utilizou nenhum inseticida ou carrapaticida, usando apenas vermífugo. Esses produtos proporcionam resultados muito diferenciados, principalmente, por conta do período do efeito residual de cada um e, portanto deve ser considerado no momento da interpretação dos resultados (**Tabela 1**). As coletas só foram realizadas após um mês de aplicação do inseticida.

Tabela 1 – Regime alimentar e manejo sanitário dos animais e município de coleta das moscas-dos-chifres nas fazendas envolvidas nesta pesquisa

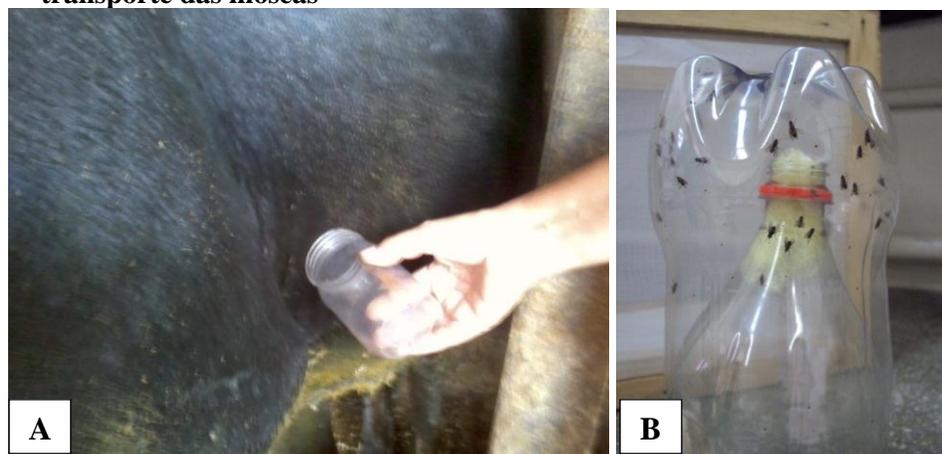
Propriedade	Alimentação		Princípios ativos	Município
	Cocho	Pasto		
Fazenda 1	Silagem de cana-de-açúcar	<i>Brachiaria decumbens</i>	Diflubenzuron	Maceió-AL
Fazenda 2	Capim elefante e ração comercial de milho	<i>Brachiaria decumbens</i>	Nenhum	Satuba-AL
Fazenda 3	Ração comercial de milho	<i>Brachiaria decumbens</i>	Diazinon	Satuba-AL

Fonte: Autor da tese, 2010.

As fêmeas grávidas eram identificadas no momento da captura por apresentarem o abdome crescido e de coloração marrom-avermelhado. As coletas das moscas-dos-chifres foram realizadas por ocasião da ordenha, enquanto os animais permaneciam amarrados.

Todas as coletas foram realizadas entre 6:30 h e 7:30 h, em dias ensolarados, nos meses de fevereiro e março de 2009. A captura das moscas-dos-chifres grávidas foi realizada com o auxílio de frascos plásticos, fechados com tampas rosqueadas (**Figura 8A**), diretamente do corpo do animal. Depois de capturada, a mosca foi transferida para uma garrafa PET (politerefitalato de etileno) com capacidade de 2 L, adaptada (**Figura 8B**), para o transporte das moscas até o laboratório. Em cada propriedade foram realizadas duas coletas e em cada coleta, foram obtidas cerca de 30 moscas.

Figura 8. A – Coleta de mosca-dos-chifres no animal e B – Garrafa PET adaptada para o transporte das moscas



Fonte: FREIRE, 2009.

As fezes coletadas possuíam cor verde e textura pastosa, devido a maior parte da alimentação do animal ser à base de vegetal. A coleta desse material ocorria no momento em que o animal evacuava, sendo coletadas três massas fecais por coleta, com o auxílio de uma pá de jardinagem, as quais foram acondicionadas em balde de plástico com capacidade para 15 L e transportadas para o laboratório.

4.2 Protocolo de criação da mosca-dos-chifres em laboratório

Foram realizadas três criações de mosca-dos-chifres em laboratório com o objetivo de obter maior número de emergência de insetos adultos

4.2.1 Primeira criação

No Laboratório de Síntese e Isolamento de Feromônio (LaSIF) do Instituto de Química e Biotecnologia, Campus A.C. Simões da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), em temperatura de 27 ± 2 °C, e umidade relativa do ar de $60 \pm 10\%$, as moscas foram transferidas para gaiola entomológica telada, com tela de nylon e dimensões de 25 x 25 x 30 cm (largura, altura e comprimento). Para facilitar a coleta dos ovos e estimular a oviposição, o fundo da gaiola foi forrado com papel toalha levemente umedecido, e sobre esse foram colocados dois pedaços de papel de filtro contendo fezes (**Figuras 9A e 9B**).

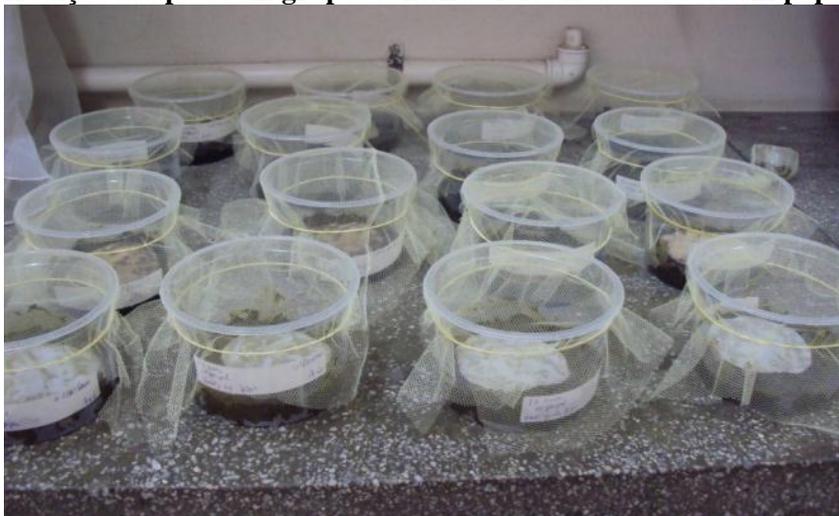


Fonte: FREIRE, 2009.

Os ovos depositados na gaiola foram cuidadosamente retirados com o auxílio de um pincel de ponta fina e cerdas macias e, em seguida, contabilizados. Após contagem, 15 ovos foram transferidos para um pedaço de papel de filtro no formato de círculo, umedecido com água destilada, para melhor visibilidade. Esse papel foi colocado diretamente em potes plásticos com capacidade de 500 mL, contendo 200 g de fezes frescas, aferidas em balança de uso doméstico.

Posteriormente, foram formados seis grupos desses potes, de acordo com o dia da coleta. Cada grupo foi composto por quatro depósitos plásticos, obtendo assim um total de 60 ovos por grupo (**Figura 10**, pág. 37). Os grupos 1 e 2 pertenciam a Fazenda 1; os grupos 2 e 3 eram do material coletado na Fazenda 2; e os grupos 5 e 6, da Fazenda 3. Os potes de todos os grupos eram tampados com pedaço de filó preso com elástico, para impedir a fuga da mosca. Esses potes eram mantidos em condições ambientais para acompanhar o desenvolvimento da mosca.

Figura 10 – Distribuição dos potes em grupos contendo fezes frescas e ovos em papel de filtro



Fonte: FREIRE, 2009.

Junto aos depósitos plásticos foram colocadas duas placas de Petri de vidro (150 x 15 mm) com 50 g de fezes e 10 ovos. Em uma placa, os ovos foram colocados diretamente nas fezes e na outra placa, os ovos foram colocados em um pedaço de papel de filtro umedecido e este sobre as fezes. Após oito dias, as pupas foram retiradas e colocadas em outras duas placas limpas, forradas com papel de filtro, para a emergência das moscas adultas. Esse método possibilitou acompanhar todas as fases do ciclo de vida desse inseto, sendo possível registrar os fatos por meio de fotografias.

Após o recolhimento dos ovos e de toda preparação dos potes com as fezes, as moscas coletadas no campo foram deixadas na gaiola entomológica sem alimentação até chegar a óbito. As moscas recém-nascidas foram contabilizadas, registrando-se todas as informações, para então serem disponibilizadas para os ensaios comportamentais.

4.2.2 Segunda criação

Foi realizada uma nova coleta das moscas grávidas e fezes bovinas na Fazenda 3, no Município de Satuba-AL.

A coleta de mosca e as condições de laboratório adotadas foram idênticas às do método utilizado nas primeiras coletas. Ao chegar do campo, as moscas foram transferidas para uma

gaiola entomológica, a qual continha pedaços de papel de filtro com fezes frescas de bovino para atração do inseto.

Após a postura, os ovos foram transferidos com auxílio de um pincel de ponta fina e cerdas macias para os depósitos plásticos contendo fezes frescas de bovino.

Nesse caso, foi modificado o processo de armazenagem dos ovos nas fezes, sendo utilizados potes menores, com capacidade para 120 mL, contendo 60 g de fezes bovinas frescas e seis ovos, colocados diretamente sobre as massas fecais. Logo após a composição dos potes, os mesmos foram colocados dentro das gaiolas entomológicas (**Figura 11**), permitindo que a mosca ao eclodir, tivesse um espaço maior para voar.

Quando finalizado o processo de arranjos dos potes com o material biológico, eles foram distribuídos em três gaiolas entomológicas (**Figura 12**, pág. 39), contendo cada uma cinco potes, totalizando 30 ovos por gaiola. Essas gaiolas foram mantidas nas condições do ambiente e esperava-se a emergência das moscas adultas.

Figura 11 – Potes dentro da gaiola entomológica



Fonte: FREIRE, 2009.

Figura 12 – Gaiolas entomológicas com a distribuição dos potes com material biológico



Fonte: FREIRE, 2009.

4.2.3 Terceira criação

As moscas-dos-chifres oriundas do campo foram coletadas em bovinos da Fazenda 3, no horário de 6:00 as 7:30 h, em dias ensolarados. Na coleta, foram usados potes plásticos com tampas rosqueadas, sendo que as moscas no momento da captura foram acomodadas diretamente na gaiola entomológica forrada com papel toalha e sempre que necessário foi borrifado um pouco de água para amenizar a temperatura. As fezes frescas foram recolhidas com o auxílio de uma pá no momento em que o animal evacuava e foram colocadas, em um balde plástico.

No laboratório foram recolhidos os ovos depositados na gaiola, transferindo-os para potes plásticos, com capacidade para 120 mL de volume, em números de 30 ovos para 90 g de fezes bovinas frescas. Os potes foram distribuídos num total de cinco grupos, cada grupo composto por duas gaiolas entomológicas, e cada gaiola continha seis potes, e depois foram armazenados em uma câmara climatizada (28 °C e 60 % umidade relativa) (**Figura 13**, pág. 40) até o surgimento das moscas adultas.

Figura 13 – Gaiola com material biológico armazenada em uma câmara climatizada



Fonte: Autor da tese, 2011.

Ao final de cada criação desenvolvida foram contabilizadas as moscas emergidas em laboratório.

4.3 Coletas dos COVs e análises cromatográficas

4.3.1 Preparação do tubo coletor com os adsorventes

Para coleta de voláteis em bovinos foi utilizado um tubo coletor de vidro (pipeta de Pasteur), contendo 100 mg de Porapak Q (50-80 Mesh, Supelco, Poole, U.K.) e lã de vidro nas duas extremidades, para reter o porapak. Após a composição do tubo coletor, o material foi levado a um forno a 130 °C por uma hora, para ativar o adsorvente antes de ser usado.

4.3.2 Coleta dos COVs nos animais da raça Pardo-Suíça

A coleta dos voláteis foi realizada em oito bovinos da raça Pardo-Suíça fêmeas, com aproximadamente quatro anos de idade, em uma propriedade particular, situada no município de Maceió, Alagoas-Brasil, cuja latitude é de 9°39'57"S e longitude 35°44'6"O. Na propriedade, os animais foram alimentados com capim bambuzinho (*Olyra polypodioides*) e no cocho foi

ofertado a esses animais silagem de cana-de-açúcar mais ração comercial a base de milho e soja. Como suplemento alimentar foi utilizado sal mineral.

As amostras de odores liberados por bovinos foram coletados no período da manhã entre 6:00 às 10:30 h, com o auxílio de um tubo coletor de vidro. Para recolher os odores liberados dos animais foi usado um tubo coletor acoplado a uma extremidade de uma mangueira de silicone e a outra extremidade da mangueira foi acoplada a uma bomba de sucção. Próximo à parte dorsal do animal foi colocado o tubo contendo adsorvente, com um fluxo de ar de 1000 mL/min por cada animal, para arrastar os odores dos bovinos.

A aeração teve duração de uma hora para cada animal, sendo que em cada indivíduo foi colocado um tubo coletor. Após o tempo determinado, os tubos foram recolhidos e embalados com papel alumínio e depois guardados em um depósito plástico e levados ao laboratório.

4.3.3 Extração em laboratório do material coletado nos animais

Ao término do tempo determinado, uma hora, os coletores foram recolhidos e levados ao Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, onde foi realizada a extração da amostra com 1 mL de hexano, depois reduzido para um volume de 100 μ L, por passagem de nitrogênio puro (White Martins) e armazenado a -20 °C. Cada amostra foi analisada em cromatógrafo gasoso.

4.3.4 Análise em Cromatógrafo Gasoso das amostras coletadas de bovinos da raça Pardo-Suíça

Para a análise cromatográfica, os odores coletados dos animais foram extraídos com hexano 1 mL e esse material foi reduzido a um volume de 25 μ L, sendo injetados 2 μ L da amostra reduzida em um cromatógrafo gasoso com detector FID (CG/FID), QP2010 plus, usando coluna RTX-5 (30 m, 0,25 mm de diâmetro interno; 0,25 μ m diâmetro do filme; Restek) usando nitrogênio como gás de arraste, temperatura inicial do forno foi de 30 °C com uma rampa de aquecimento de 10 °C/min até 250 °C, com injetor “splitless” e detector com temperatura de 250 °C e 350 °C, respectivamente.

Para auxiliar na identificação dos compostos existentes nas amostras coletadas nos bovinos foram utilizados *n*-alcanos (Sigma-Aldrich, C₇-C₃₀), obtendo assim o índice de retenção

Kóvats. Para quantificar esses compostos foi adicionado a cada amostra 1 μL do padrão interno (2-nonadecanona), na concentração de 0,026 mg/mL. Os compostos foram identificados pelo cálculo do índice de retenção Kóvats e comparados pelas bases de dados, Pherobase e Wiley229.

4.4 Coleta de COVs em bovinos de diferentes raças

A coleta dos voláteis foi realizada em bovinos com aproximadamente quatro anos de idade, em duas propriedades particulares, vizinhas, situadas no município de Maceió, Alagoas-Brasil, cuja latitude é de 9°39'57"S e longitude 35°44'6"O. Na Fazenda 1, os animais foram alimentados com capim braquiária (*Brachiaria decumbens*) em pasto e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) triturada com ureia mais farelo comercial a base de milho e trigo no cocho. Na Fazenda 2, os animais no campo se alimentavam de capim bambuzinho (*Olyra polypodioides*) e no cocho, foram-lhes ofertados silagem de cana-de-açúcar mais ração comercial a base de milho e soja. O sal mineral servia como suplemento alimentar nas duas fazendas.

Na Fazenda 1, foram coletados odores de três animais machos e três animais fêmeas, das raças bovinas: Holandesa, Pardo Suíço, Nelore e Gir e na Fazenda 2, apenas na raça Girolando, sendo a coleta realizadas em três animais de cada sexo. Foram usados quatros tubos coletores em cada animal e a coleta durava em torno de uma hora por animal. Após o fim de cada coleta, foi trocado o animal por outro do mesmo sexo, como também foram usados novos tubos coletores, realizando assim nova coleta. A coleta nos animais-fêmeas ocorria após a ordenha e os animais machos foram presos no tronco de contenção para facilitar a coleta.

As amostras de odores liberados por bovinos foram coletados no período da manhã entre 6:00 e 10:30 h., em dias ensolarados dos meses de janeiro e fevereiro de 2011, com o auxílio de tubos coletores de vidro contendo 100 mg de Porapak Q (50-80 mesh, Supelco, Poole, U.K.), como adsorvente e lã de vidro. Para recolher os odores liberados dos animais foram usados dois tubos coletores acoplados a uma conexão de vidro em forma de Y e essa à extremidade de uma mangueira de silicone. A outra extremidade da mangueira foi acoplada a uma bomba de sucção (**Figura 14**, pág. 43), em cada animal eram usadas duas mangueiras com esses apetrechos citados acima, permitindo assim o uso de quatro tubos coletores por animal. Próximo à parte dorsal do animal, cabeça, cerca de 3 cm, foram colocados os tubos contendo adsorvente (**Figura 15**, pág. 43), com um fluxo de ar de 1000 mL/min, para arrastar os odores dos bovinos.

Figura 14– Coleta dos COVs no animal



Fonte: Autor da tese, 2011.

Figura 15- Tubos coletores sobre o dorso do animal



Fonte: Autor da tese, 2011.

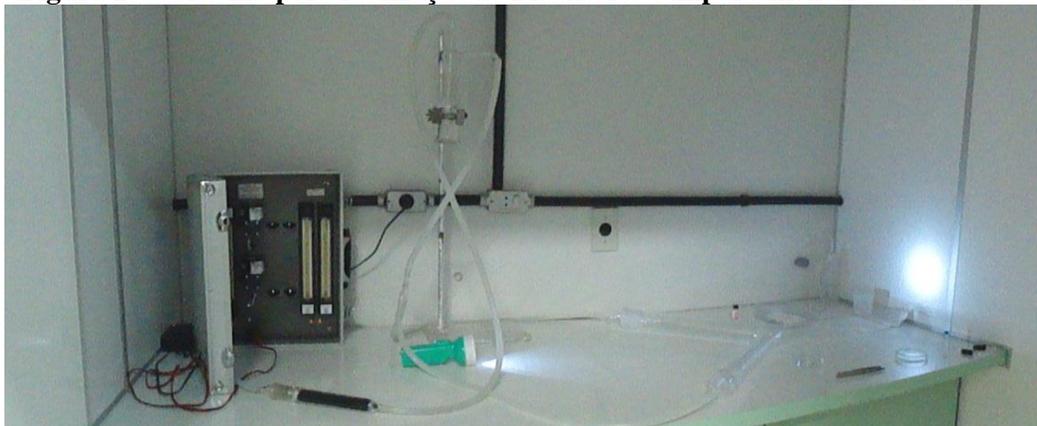
Ao fim da coleta, os tubos foram recolhidos e embalados com papel alumínio e depois guardados em um depósito plástico

Ao término do tempo determinado, os coletores foram recolhidos e levados ao Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN) do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para a extração da amostra com 1 mL de hexano bidestilado. O material extraído foi concentrado para 100 µL, por passagem de nitrogênio puro (White Martins). Logo após, a amostra concentrada foi armazenada em frasco de vidro de 1,5 mL (Shimadzu Corporation) a -20 °C. Uma das quatro amostras foi selecionada para ser analisada em um Cromatógrafo a Gás (CG) e logo após em um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG/EM) e as demais amostras foram utilizadas nos ensaios.

4.5 Bioensaios comportamentais em olfatômetro do tipo Y com COVs oriundos dos animais

O comportamento das moscas-dos-chifres frente aos voláteis coletados nos bovinos foi analisado com um olfatômetro, na forma de um tubo de vidro em Y (tronco, 240 mm; braços, 290 mm; 45° ângulo; diâmetro interno, 40 mm) conectado pelos braços a mangueiras de silicone e estas, a um umidificador contendo 300 mL de água destilada (**Figura 16**, pág. 45). A outra parte do umidificador foi acoplada a um filtro de ar e este ligado a um fluxômetro. O fluxo de ar, purificado por filtro de carvão ativo, dentro do olfatômetro foi de 1200 mL/min. O experimento ocorreu em uma sala escura com 25 ± 2 °C e umidade relativa do ar em torno de 50 %. Uma lanterna com 6 luzes de LED (400 mAH, Voltagem electronicsart, VT-73338L) iluminou a junção deste tubo durante a realização de cada experimento. A lanterna foi colocada a uma distância de 40 cm do olfatômetro.

Figura 16 – Sistema para realização de Bioensaios comportamentais com a mosca



Fonte: GOMES DE OLIVEIRA, 2012.

Em cada conexão dos braços do tubo em Y, foram colocados pedaços de papel de filtro na forma de triângulo (3 cm x 3 cm x 3 cm), contendo 10 μ L da amostra oriunda dos bovinos e como amostra controle foram usados 10 μ L do solvente (hexano grau HPLC, bidestilado).

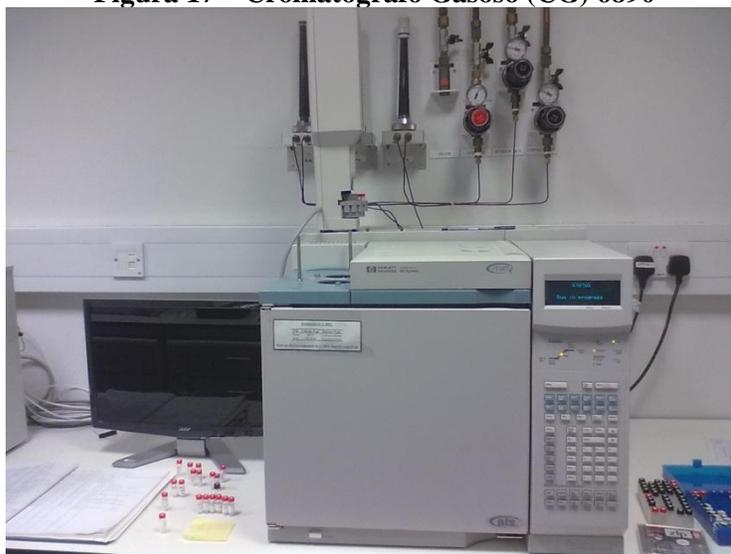
No bioensaio de olfatometria foram utilizadas 10 moscas por sexo de cada raça bovina. Utilizaram-se as moscas obtidas da criação em laboratório, com aproximadamente 24 h de idade, mantidas uniformemente em uma temperatura de 25 ± 2 °C. Após a instalação de todo sistema de olfatometria, uma mosca foi inserida no tronco do olfatômetro e a partir daí, esse indivíduo foi observado por 10 minutos, de acordo com Oyarzún et al., (2009). Caso ela fosse para o braço do Y que continha a amostra coletada no bovino, o resultado foi considerado positivo, caso contrário, negativo. Após o período pré-estabelecido, se a mosca não escolhesse um caminho, ela era descartada. Esse processo foi realizado em triplicata, sendo alternada a posição do olfatômetro e os locais dos papéis de filtro com a amostra e solvente, a cada 10 experimentos realizados.

Apenas foram contabilizados como resposta positiva de atração, os experimentos com as moscas que foram até o final do braço com o papel de filtro contendo o extrato dos odores oriundo do animal. Todas as partes do olfatômetro foram limpas com detergente neutro, álcool e depois secos ao ar por 1 hora, quando ocorria a troca da amostra. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste do qui-quadrado.

4.6 Análise em Cromatógrafo Gasoso (CG) das amostras coletadas em diferentes raças bovinas

Para a análise de cromatografia gasosa foi injetado 1 μL , de cada amostra coletada nas diferentes raças de bovinos, em um Cromatógrafo Gasoso (CG) Agilent 6890 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) com coluna HP-1 (50 m, 0,32 mm de diâmetro, apolar - Hewlett Packard, Palo Alto, C.A.) e detector de ionização de chamas (**Figura 17**). Para cada análise, a temperatura foi mantida a 50 °C por dois minutos, com uma rampa de aquecimento de 10 °C/min até 230 °C. O equipamento pertencia ao Rothamsted Research, situado em Harpenden-Reino Unido. Foram utilizados *n*-alcanos (Sigma-Aldrich C₇-C₂₅) na identificação dos compostos existentes nas amostras e 1 μL do Padrão Interno (2-nonadecanona), na concentração de 0,026 mg/mL (Fluka AG Chemische Fabrik), diluído em hexano destilado para quantificar os compostos. Após a injeção, foram selecionadas as amostras com maior número de picos de cada raça (ambos os sexos) e estas foram injetadas em um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG/EM).

Figura 17 – Cromatógrafo Gasoso (CG) 6890



Fonte: SILVA FILHO, 2012.

4.7 Análise em Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG/EM) das amostras coletadas em diferentes raças bovinas

Para a análise cromatográfica, os odores coletados dos animais foram extraídos com 1 mL de hexano bidestilado e esse material foi concentrado com nitrogênio puro até 25 μ L, sendo injetados 2 μ L da amostra concentrada, em um Cromatógrafo Gasoso Acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG/EM), QP2010 plus, (**Figura 18**) utilizando-se coluna RTX-1 (60 m, 0,25 mm de diâmetro; Shimadzu), com ionização de impacto de elétrons (70 eV), usando Hélio como gás de arraste, com temperatura inicial do forno em 30 °C, com uma rampa de aquecimento de 10 °C/min até 250 °C, com injetor splitless e detector, na temperatura de 250 °C a 350 °C, respectivamente. Para identificar os compostos existentes nas amostras foram utilizados *n*-alcanos (Sigma-Aldrich C₇-C₃₀) padrão e para quantificar, foi adicionada a cada uma das amostras, 1 μ L do padrão interno (2-nonadecanona), na concentração de 0,026 mg/mL (Fluka AG Chemische Fabrik), diluído em hexano destilado.

Os compostos foram identificados pelo cálculo do índice de retenção Kovats e comparado pelas bases de dados, Pherobase e Wiley 229.

Figura 18 – Cromatógrafo Gasoso Acoplado a um Espectrômetro de massa (CG/EM)



Fonte: OLIVEIRA, 2012.

4.8 Teste de atividade em Cromatografia Gasosa/Eletroantenografia - CG/EAG

Dentre todas as amostras de voláteis obtidas das raças bovinas estudadas, apenas uma amostra da raça Girolando (fêmea), a qual apresentou maior número de picos depois de injetada no CG, foi utilizada para testar a atividade em Cromatografia Gasosa/Eletroantenografia - CG/EAG. O teste foi realizado pelo grupo de pesquisa do Dr. Mike A. Birkett (Rothamsted Research – Inglaterra), utilizando antenas de mosca-dos-estábulo, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), pelo fato da não disponibilidade da mosca-dos-chifres na região.

A amostra foi injetada em um CG (AI93 GC; AI Cambridge, UK) equipado com uma coluna (50 m; 0.32 mm de diâmetro interno, HP-1), com temperatura de forno inicial sendo mantida em 40 °C por 1 min, com uma rampa de aquecimento de 10 °C/min até 250 °C, usando hidrogênio como gás de arraste. As saídas do EAG amplificador e o FID foram monitorizados simultaneamente sobre um registrador gráfico.

Os compostos considerados biologicamente ativos por CG/EAG, foram obtidos comercialmente e utilizados nos bioensaios comportamentais com *H. irritans*, realizados no LPqRN/UFAL. Os compostos com grau de pureza de 99,9% (Merck Sharp and Dhone, Hoddesdon, Reino Unido), fizeram parte de soluções preparadas com hexano bidestilado nas concentrações de 10^{-8} a 10^{-4} mg/mL, depois de concentrados foram colocados em frascos de vidro de 1,5 mL, depois armazenados a -20 °C.

4.9 Bioensaios comportamentais em olfatômetro do tipo Y com compostos padrões detectados no CG/EAG

Os bioensaios foram realizados no mês de abril de 2012, utilizando o mesmo sistema de olfatometria usado nos testes comportamentais com os COVs oriundos das raças bovinas aqui estudadas. Para iluminar a junção do sistema durante a realização dos experimentos foi usada uma lanterna com seis luzes de LED (400 mAH, voltagem electronicsart, VT-73338L). A lanterna foi colocada a uma distância de 40 cm do olfatômetro. As condições de temperatura do ambiente, uma sala escura, foram de 25 ± 2 °C e a umidade relativa do ar variou de 46 % a 68 %.

Em um dos braços do tubo em Y, foi colocado pedaço de papel de filtro na forma de triângulo (3 cm x 3 cm x 3 cm), contendo 10 µL do composto padrão, e no outro foi colocado o controle, usando 10 µL do solvente (hexano grau HPLC, bidestilado), esse solvente também foi colocado em papel de filtro nas mesmas dimensões utilizadas para o composto padrão.

Para os bioensaios, foram utilizadas 20 moscas para cada concentração dos compostos padrões. Essas moscas foram procedentes de coletas em animais das raças Pardo-Suíça e Girolando, sendo machos e fêmeas, já que ambos os sexos possuem ação hematófaga sobre o animal.

As moscas-dos-chifres foram coletadas entre 6:00 h e 8:30 h, com auxílio de um frasco com tampa rosqueada e assim transferidas para gaiolas entomológicas, sendo alimentadas com solução de mel (comercial) a 5%. Foram coletadas diariamente cerca de 200 moscas, em seguida transportadas para o laboratório (LPqRN), e então separadas, colocadas individualmente em tubos de ensaios. Os tubos de ensaios são fechados com algodão, colocados em estante de aço e levados à sala de bioensaio.

No bioensaio, foi estipulado para cada mosca um período de 10 minutos para observação, de acordo com Oyarzún et al., (2009). Porém a partir do momento que ela se manifestasse e escolhesse para onde foi atraída, essa observação foi computada como positiva ou negativa e finalizada. Sendo positiva quando a escolha foi para o composto sintético e negativa quando a escolha foi pelo controle (solvente). Caso não houvesse manifestação pela mosca e, ela permanecesse imóvel durante todo o período determinado, ela era recolhida, descartada e substituída.

A cada 10 experimentos realizados foi alternado a posição do tubo em Y e os locais dos papéis de filtro com o composto e solvente. Apenas foram contabilizados como resposta positiva de atração, os experimentos com as moscas que seguissem até o final do braço com o papel de filtro contendo a substância padrão. Entre os experimentos, todas as partes do olfatômetro foram limpas com detergente neutro, álcool e depois secados ao ar por 1 h. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste do qui-quadrado.

4.10 Análise Estatística da diferença dos COVs entre as raças estudadas

Técnicas estatísticas multivariadas foram utilizadas com a finalidade de determinar a existência de efeito de raça e efeito de sexo dos bovinos sobre os compostos orgânicos voláteis emitidos, após identificados no CG/EM. Para isso, aplicaram-se técnicas como distância Euclidiana Média, em que as raças foram agrupadas pelo método de Tocher (CRUZ & REGAZZI, 2004). As análises foram realizadas com o auxílio do software Genes (CRUZ, 2006).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Protocolo de criação da mosca-dos-chifres em laboratório

Nas duas placas de Petri de vidro preparadas para observar o ciclo de vida da mosca-dos-chifres observou-se que na placa que continha papel de filtro apenas 70% dos ovos foram viáveis, provavelmente devido a ocorrência de uma grande contaminação por fungo. A placa na qual os ovos foram colocados diretamente nas fezes, houve 100% de eclosão.

Os ovos oriundos das moscas coletadas em campo apresentaram em sua grande maioria, coloração marrom-avermelhada e, em menor quantidade, as cores amarelo-claro ou branca. Resultados semelhantes foram relatados por Bruce (1964). Os ovos possuíam certo brilho e o formato de um grão de arroz podendo ser colocados em grupos ou isolados (**Figura 19**). Os ovos eclodiram 24 h após o momento da postura condizendo com as descrições de Campos et al. (2008).

Figura 19 – Ovos de mosca-dos-chifres individuais e em grupos



Fonte: FREIRE, 2009.

Foi possível a visualização da mosca ovipositando no interior da gaiola e fora das fezes (**Figura 20**, pág. 52), como também a constatação da deposição de ovos ocorrida após o período de uma hora de observação. Esses fatos ocorridos na fase de oviposição da mosca-dos-chifres mostram que a mesma pode ovipositar na ausência das fezes e que o tempo para sua oviposição é imprevisível.

Figura 20 – Mosca-dos-chifres no momento da postura



Fonte: FREIRE, 2009.

Com relação aos estágios das larvas, foi possível constatar a larva de primeiro e terceiros instares. Assim sendo, observou-se que larvas de primeiro ínstar apresentam formato cilíndrico, com espinhos nas laterais e sua porção posterior é mais larga que a anterior (**Figura 21A**) e que larvas de terceiro ínstar possuem a superfície dorsal lisa (**Figura 21B**), conforme descrito por Brito et al, 2005.

Figura 21A – Larva de primeiro instar de *H. irritans*; 21B – Larva de terceiro instar de *H. irritans*



A



B

Fonte: FREIRE, 2009.

As larvas, após um período de oito dias, empupavam, apresentando coloração marrom-avermelhada e formato cilíndrico oval (**Figura 22**, pág. 53). Após essa fase, ocorria a emergência do inseto adulto, que ficava imóvel por alguns minutos, para enrijecer as nervuras das asas e ambientação e, em seguida, iniciava o voo.

Figura 22 – Pupa de *H. irritans*



Fonte: FREIRE, 2009.

5.1.1 Primeira criação

Nesse método, foi obtido um total de 360 ovos, com apenas 67 destes se transformando em larva, pupa e chegando à fase de mosca adulta.

Durante o desenvolvimento da criação foi detectada a presença de fungo nos potes com ovos. Esse fato pode ter sido a razão pela qual emergiu uma pequena porcentagem de mosca-dos-chifres, 18,61 %. Provavelmente, essa baixa emergência foi devida à competição entre fungos e as larvas de moscas por alimento, fezes em decomposição, resultando em menor quantidade de larvas que conseguiram atingir os estágios de pupa e completar seu desenvolvimento até a fase adulta. Alguns potes apresentaram maior ataque de fungos do que outros, como os dos grupos 4 e 5 e menor número de moscas emergidas, 2 e 1, respectivamente.

Os fatores que também podem ter contribuído com a baixa emergência são àqueles que constituíam o ambiente de cada local de coleta, dentre eles podem ser citados o manejo nutricional e o manejo sanitário. Acredita-se que o manejo sanitário, no que diz respeito aos princípios ativos empregados no controle de endo e ectoparasitas são aqueles que possuem maior potencial para influenciar na variável em estudo. Outro fator que pode ter influenciado a baixa emergência da mosca-dos-chifres em laboratório foi a alta umidade constante do ambiente, influenciando no desenvolvimento deste inseto.

As moscas oriundas de animais tratados com produtos mosquicidas podem apresentar maior fragilidade que as moscas dos animais sem tratamento químico, alterando na sua capacidade de oviposição, na qualidade dos ovos e, provavelmente, na viabilidade dos mesmos.

De acordo com a distribuição dos grupos por fazendas, percebeu-se que os grupos com ovos oriundos das moscas coletadas na Fazenda 2, grupos 3 e 4, apresentaram menor taxa de

emergência de moscas adultas, 13 moscas, seguidos pelos grupos da Fazenda 3, grupos 5 e 6, com 20 moscas. O maior número de emergência foi obtido do material oriundo da Fazenda 1, grupos 1 e 2, com 34 moscas.

5.1.2 Segunda criação

Na segunda criação, a média percentual de moscas emergidas em laboratório foi de 55,55 %. Estes resultados estão ligeiramente acima dos obtidos por Carvalho et al. (2009) que foi de 50 % e abaixo daqueles obtidos por Sereno & Sereno (1999) que foram de 69 % e 74 % de moscas emergidas em massas fecais de bovinos da raça nelore e pantaneiro, respectivamente e por Barros (2002) com 79 % de emergência de moscas-dos-chifres oriundas da raça nelore.

É de fundamental importância mencionar que com a retirada do papel de filtro do experimento, o aparecimento de fungos nas fezes foi em menor quantidade do que na primeira criação.

A baixa emergência de moscas existentes nos experimentos desta pesquisa pode ser creditada a vários fatores como: temperatura; umidade do ambiente; contaminação por fungos; a não maturação dos ovos; a mudança de ambiente da mosca (do campo para laboratório); implicações encontradas no campo, como a aplicação de inseticidas sintéticos nos animais que podem afetar os insetos hematófagos e esse passarem para seus descendentes.

5.1.3 Terceira criação

Os resultados obtidos neste experimento revelam que dentro da câmara de refrigeração não houve contaminação por fungos e as moscas começaram a emergir entre 10 e 12 dias. Dentre todas as moscas recém-nascidas, duas delas nasceram com defeitos nas asas, as quais se apresentavam encolhidas. Esse fato pode ter ocorrido no processo de formação do inseto. Algumas moscas emergiram, mas o seu período de sobrevivência foi muito curto, menos de 12 h. Na maior parte desta metodologia, a maioria das moscas sobreviveu por um período de aproximadamente 48 h, sem alimentação.

A viabilidade dos ovos nesta etapa foi maior do que aquela nas primeiras criações, onde o maior valor para emergência foi de 95,55 % e o menor de 55,55 %, (**Tabela 2**, pág. 55)

Tabela 2 – Valores médio, máximo e mínimo de viabilidade (%) de emergência de moscas-dos-chifres nas três criações

	Criação		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a
Viabilidade (%)	18,61 ± 20,00	55,56 ± 15,03	78,22 ± 14,33
Mínimo	0,00	40,00	55,55
Máximo	66,70	70,00	95,55

Fonte: Autor da tese, 2012.

Entende-se que o uso da câmara de refrigeração foi de grande importância para a criação, onde se consegue determinar a temperatura e a umidade relativas ideais para condicionar o material biológico que permitirá a emergência do inseto adulto.

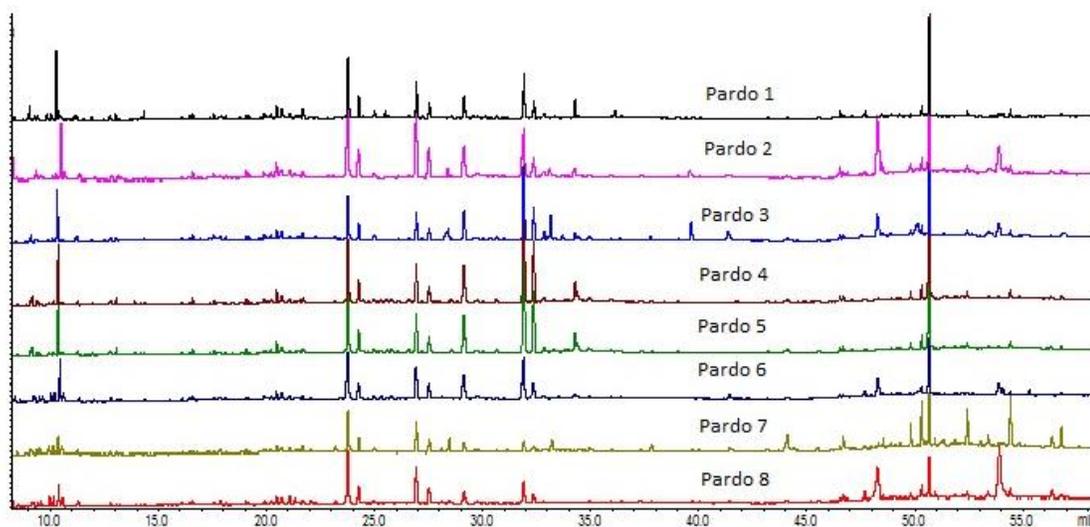
5.2 Eficiência da metodologia da coleta de COVs em bovinos

Para averiguar a eficiência da coleta de COVs em bovinos, foi estabelecido o uso de apenas uma raça bovina para as extrações de COVs realizadas neste trabalho. Para tanto foi escolhida aleatoriamente a raça Pardo-Suíça, sendo realizadas coletas em oito animais fêmeas desta raça. As amostras obtidas nas coletas foram injetadas em um aparelho de cromatografia gasosa, obtendo-se assim os perfis cromatográficos das mesmas.

Para comprovar a eficiência da metodologia utilizada na coleta de COVs em bovinos, os perfis cromatográficos foram sobrepostos (**Figura 23**, pág. 56), para melhor visualizar, a repetibilidade do método, por comparação do tempo de retenção.

Os picos de maior intensidade visíveis em todas as amostras, dos perfis cromatográficos, referem-se aos seguintes tempos de retenção: 10:13, 10:26, 10:38, 10:47, 20:46, 20:71, 21:07, 21:33, 21:69, 24:27, 26:94, 27:53, 29:13, 32:37, 32:85, 46:69, 47:10, 47:22 e 50:31 min., que com o cálculo do KI foram representados pelos compostos: nonanol, (*E*)-2-metil-6-metileno-2,7-octadienol, acetato de 3-(metiltio)-propila, acetato de 3-octanila, octanoato de butila, (*Z*)-4-dodecenal, (*E*)-9-dodecenal, (*E*)-10-dodecenal, β-gurjuneno, 1-metil-5-metil-5-metileno-8-(1-metiletil)-[s-(*E,E*)]-1,6-ciclodecadieno, octanodioato de dietila, acetato de (*Z*)-8-dodecenila, (*Z*)-3-tetradecenol, octanoato de octila, (*Z*)-7-hexadecenol, 2-metiltetracosano, 3-metiltetracosano, 1,2,3-benzenetriol e Padrão Interno, respectivamente.

Figura 23 – Comparação dos perfis cromatográficos da raça Pardo-Suíça

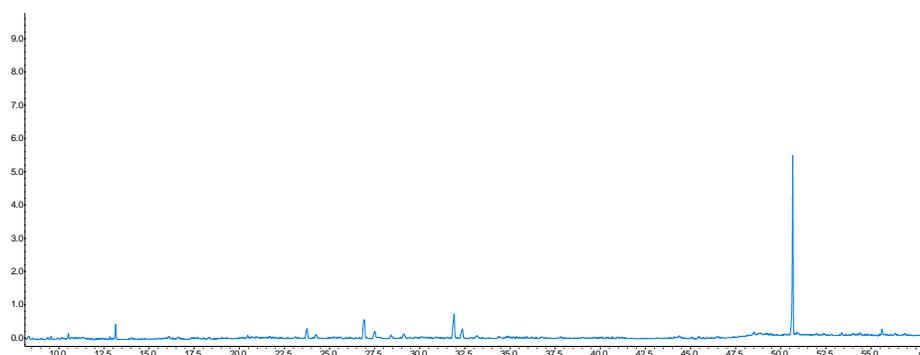


Fonte: Autor da tese, 2012.

Como já era esperado o branco (**Figura 24**) exibiu alguns compostos existentes nos cromatogramas acima, já que a coleta do branco foi no local onde circulavam os animais. Essa figura deixa claro que sua composição não difere muito com relação aos picos apresentados nos cromatogramas oriundos das amostras animais.

A amostra do ambiente, branco, apresenta um composto que difere das demais amostras, que é o (Z)-4-decenal. Esse composto aparece no cromatograma em um tempo de retenção de 13:51 minutos.

Figura 24 – Cromatograma da amostra do ambiente (branco)



Fonte: Autor da tese, 2012.

Sendo assim permite-se dizer que a metodologia utilizada para coleta de COVs em animais é eficiente já que a maior parte dos compostos repetiu-se em todas as amostras, variando apenas a quantidade. Este fato naturalmente pode ocorrer já que se está avaliando indivíduos diferentes dentro de uma mesma raça, pois cada organismo possui característica própria, apesar de pertencer a um mesmo grupo racial.

5.3 Identificação dos COVs das amostras dos animais em CG

A obtenção de um perfil cromatográfico gerado por um cromatógrafo gasoso das amostras é uma ferramenta de grande importância na identificação dos compostos que podem vir a atuar no estímulo do inseto em busca do animal. Perfis cromatográficos iguais implicam em composição igual. Este fato pode colaborar bastante com as análises definindo quais os possíveis compostos atraentes ou repelentes. Os picos comuns a todas as raças existentes nos perfis cromatográficos seriam prováveis atraentes e aqueles que apenas apareceram nos cromatogramas das raças que são consideradas geneticamente resistentes aos ectoparasitas, poderiam ser prováveis repelentes.

As amostras oriundas de bovinos das raças: Girolando, Holandesa, Pardo-Suíça, Nelore e Gir, quando analisadas em um cromatógrafo gasoso, apresentaram diferenças em sua composição, sendo que a amostra oriunda de Girolando (macho e fêmea) foi a que apresentou maior número de picos.

A identificação dos COVs liberados por fêmeas e machos bovinos das raças Girolando, Holandesa, Pardo-Suíça, Nelore e Gir foi realizada pela análise de CG (**Figura 25**, pág. 58).

Figura 25 – Perfil cromatográfico dos COVs liberados por fêmeas e machos bovinos das raças Girolando, Holandesa, Pardo-Suíça, Nelore e Gir (APÊNDICE)

(Continua)

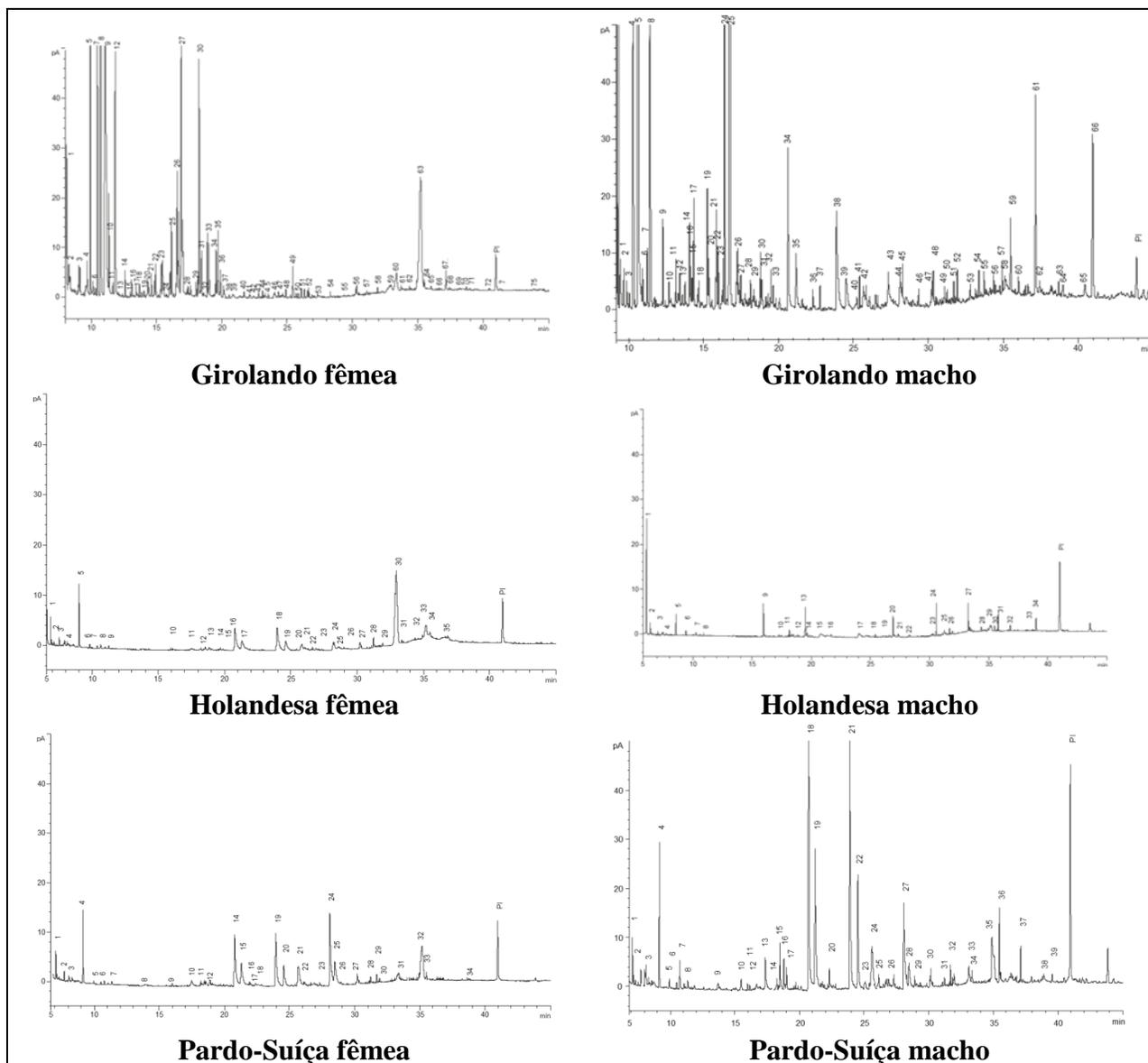
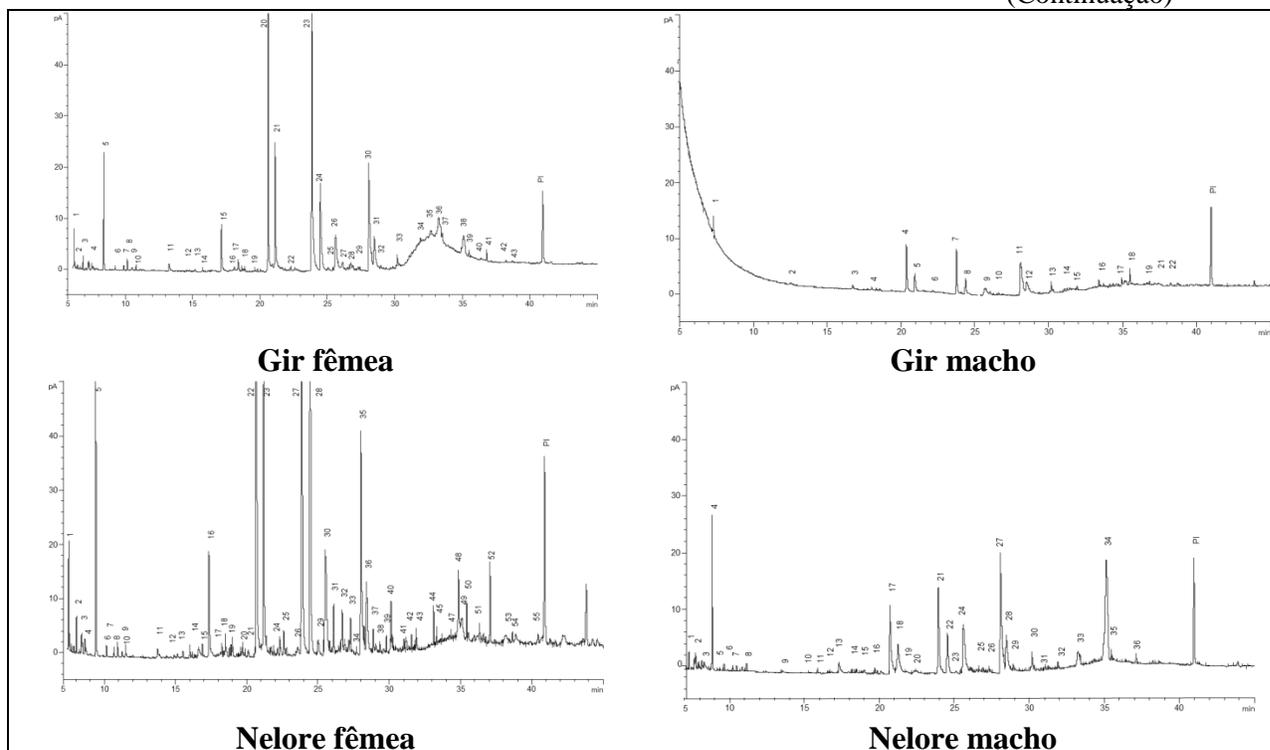


Figura 25 – Perfil cromatográfico dos COVs liberados por fêmeas e machos bovinos das raças Girolando, Holandesa, Pardo-Suíça, Nelore e Gir (ANEXO)

(Continuação)



Fonte: Autor da tese, 2012.

Os cromatogramas obtidos do CG revelam uma variedade de picos para cada amostra, independente de raça ou do sexo do animal. Para a raça Girolando, a amostra de fêmea apresentou 75 COVs e a do macho 66; para a Holandesa 35 COVs estão presentes na amostra de fêmea e 34 estão na amostra de macho; 34 substâncias voláteis apareceram na amostra de fêmea da raça Pardo-Suíça e 39 na amostra de macho desta mesma raça; foram detectados 55 e 35 COVs nas amostras de fêmea e macho da raça Nelore, respectivamente. No perfil cromatográfico da raça Gir, 43 COVs estão presentes na amostra de fêmea e 23 estão nas amostras de macho dessa raça. Todos os cromatogramas apresentam o Padrão Interno (PI) no tempo de retenção de 40.94 minutos.

Analisando-se os cromatogramas (**Figura 25**) verifica-se que cerca de 17 compostos orgânicos voláteis estão em todas as amostras analisadas, independentemente de raça ou de sexo.

5.4 Análise das amostras de extração de COVs oriundos de bovinos por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas

Os compostos das amostras coletadas em bovinos após análise por CG/EM estão listados na **tabela 3** (pág. 61). Nesta tabela pode-se observar que foi obtido um total de 105 compostos, dentre esses, nove estão presentes em animais fêmeas e machos de todas as raças, sendo eles: canfeno, 2-etil-hexanal, 2-heptenal, 1-octen-3-ona, 1-octen-3-ol, octan-3-ona, octanal, 2,2,8-trimetildecano e butirato de 2-feniletila (**Figura 26**, pág. 66 e **Figuras 27**, pág. 67). Além destes nove compostos, as amostras de fêmeas apresentaram mais dois compostos em comum que foram o undecano e o 8,14-cedranóxido e as amostras de machos apresentaram apenas um composto a mais que foi o 1,4- α -dimetil-7-(1-metiletilideno)-deca-hidronaftaleno-1-ol. As amostras de fêmea e macho da raça Girolando apresentaram o maior número de compostos, 64 e 53, respectivamente, sendo 37 deles comuns a ambos os sexos. Os exemplares coletados em animais da raça Holandesa mostraram nove compostos idênticos tanto para macho como para fêmea. A raça Pardo Suíço apresentou 15 compostos iguais nos dois sexos. As amostras de fêmea e macho de bovinos da raça Gir possuíam 19 compostos análogos e 15 compostos foram comuns para ambos os sexos da raça Nelore. Os compostos 2-metoxibenzoato de metila, 4-etilbenzaldeído e benzeno foram identificados apenas nas amostras de bovinos de fêmeas das raças bovinas indianas, mas não nas fêmeas bovinas europeias (**Figura 28**, pág. 68). A concentração dos compostos voláteis extraídos dos bovinos variou entre as raças e sexos dos animais. A maior foi de 38.915,48 ng encontrada no composto 3-metil-1-noneno na amostra de bovino macho Girolando e, a menor concentração foi de 0,11 ng, obtida para o composto (*E*)-2-octenal, pertencente à amostra de bovino fêmea Nelore (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Compostos Orgânicos Voláteis identificados por CG/EM em amostras raças de bovinas

(Continua)

COMPOSTO	Índice de Kovats	QUANTIDADE (ng)										
		GIROLANDO		HOLANDESA		PARDO SUÍÇO		GIR		NELORE		
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	
3-(Metiltio)-propanal	903	-	-	-	4,93	22.032,11	-	-	-	-	-	318,63
(E,E)-2,4-Hexadienal	910	-	-	-	-	-	14.416,98	-	-	-	-	0,63
Acetato de pentila	915	28,15	-	58,17	-	-	-	-	-	-	-	-
Mirceno	919	141,85	45,318	-	-	-	-	124,45	-	-	-	-
α-Pineno	939	10,36	116,88	109,59	154,00	-	-	175,62	66,5	-	-	0,81
3-Metil-1-noneno	944	-	38.915,48	5.193,09	5,45	2.799,03	2.373,73	-	-	-	-	34,60
Canfeno	952	15.655,67	9.756,77	11.203,10	14,65	5.722,49	4.839,87	6.459,61	230,76	668,99	81,16	81,16
2-Etilexanal	955	78,57	2.141,35	2.460,21	30,01	1301,43	1.177,51	13.304,7	469,24	1.419,36	17,31	17,31
1-Isopropil-4-Metilenobicyclo[3,1,0]Hex-2-ene	957	22,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Heptenal	964	12,13	3.046,86	7,24	27,93	1.737,59	1.645,27	3.583,13	119,94	388,98	24,16	24,16
1-Etil-3-Metilbenzene	968	81,62	-	-	-	-	-	5,90	171,20	535,59	-	-
1-Octen-3-ona	977	15,13	400,87	449,98	20,43	225,65	222,10	681,64	23,69	74,27	3,08	3,08
1-Octen-3-ol	980	20,25	219,71	218,90	17,43	107,44	106,26	332,07	11,55	35,99	1,45	1,45
3-Octanona	984	121,87	383,17	176,91	5,84	84,14	87,01	270,37	9,42	29,76	1.264,73	1.264,73
Octanal	999	764,46	9.738,12	9.169,18	16,72	4.550,62	4.127,21	12.066,7	402,11	1.367,14	68,37	68,37
Acetato de 3-metil-4-pentenila	1006	-	-	-	-	-	-	-	2,18	-	-	-
2,2,8-Trimetildecano	1022	180,48	386,99	10,45	15,82	3,55	14,26	47,30	2,68	9,26	85,23	85,23
2,4-Dimetilcicloexanol	1032	10,89	29,77	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Autor da tese, 2012.

Tabela 3 – Compostos Orgânicos Voláteis identificados por CG/EM em amostras raças de bovinas

(Continuação)

COMPOSTO	Índice de Kovats	QUANTIDADE (ng)									
		GIROLANDO		HOLANDESA		PARDO SUÍÇO		GIR		NELORE	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
(E)-3-Octen-2-ona	1034	25,41	52,26	-	-	-	1,22	4,48	0,44	1,06	-
2-Hidroxibenzaldeído	1041	3,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)-3,7-Dimetil-1,3,6-Octatrieno	1050	13,57	29,61	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)-2-Octenal	1056	68,31	129,63	-	-	-	-	-	-	0,11	-
2-Metilbenzaldeído	1066	15,72	8,82	-	10,70	-	-	-	-	-	-
(E,E)-3,5-Octadien-2-ona	1068	26,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Heptanona	1069	0,49	9,02	-	-	-	-	-	-	-	-
Octan-1-ol	1074	6,36	49,54	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Metil-1-deceno	1085	-	15,34	-	-	-	-	-	-	-	-
2-(1-Metiletil)-fenol	1089	-	-	-	-	-	-	-	11,69	-	-
Acetato de butila	1097	8,52	13,61	-	-	-	-	-	-	-	-
Undecane	1099	2,37	29,07	5,37	-	3,34	4,95	47,30	1,19	1,37	51,67
Tetradecane	1116	10,80	54,34	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)-Mircenol	1118	8,90	-	-	323,77	-	-	-	-	-	-
α -Canfolenal	1125	92,63	-	-	36,84	-	-	-	-	-	-
Cânfora	1143	72,93	-	-	7,69	-	-	-	-	-	-
Etilbenzeno	1152	75,22	5,83	-	-	-	-	-	-	-	-
Citronelal	1161	972,57	2.253,31	-	423,76	-	-	-	-	-	-
4-Metiloctano	1167	28,97	-	-	1,64	-	-	-	-	-	-
1-(4-Metilfenil)-etanona	1182	71,81	159,74	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Autor da tese, 2012.

Tabela 3 – Compostos Orgânicos Voláteis identificados por CG/EM em amostras raças de bovinas

(Continuação)

COMPOSTO	Índice de Kovats	QUANTIDADE (ng)									
		GIROLANDO		HOLANDESA		PARDO SUÍÇO		GIR		NELORE	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
1,2-Benzenodiol	1197	5,06	18,01	-	3,88	-	-	-	-	-	-
Dodecano	1199	5,82	17,39	-	-	-	-	-	-	-	-
(Z)-3-Fenil-2-propenal	1215	13,13	6,15	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Hidroxi-1,8-cineol	1218	11,39	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-Metil-2-(propano-2-ilideno)-cicloexanona	1237	12,45	38,36	-	-	-	-	-	-	-	-
4,6-Dimetilindano	1247	8,66	35,46	-	-	-	-	-	-	-	-
4-(2-Propenil)-fenol	1253	2,15	16,45	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato de linalol	1257	37,11	6,36	-	-	-	-	-	-	-	-
5-Butil-diidrofurano-2(3H)-ona	1262	9,28	16,98	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Feniletanol acetato	1265	3,31	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cis-4-isopropenil-1-metil-7-Oxabiciclo[4,1,0]Heptan-2-ona	1268	12,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(3-Metoxifenil)-metanol	1279	17,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Metilnaftaleno	1281	12,91	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,2,4-Trimetilbenzeno	1284	3,65	8,00	-	-	-	-	-	-	-	-
3-Metil-1-(3-metil-2-furil)-2-butenol-1-ona	1298	-	13,02	-	-	-	-	-	-	-	-
Tridecano	1299	25,19	7,27	-	-	-	2,55	-	-	-	-
1,3-Benzodioxol-5-ol	1312	25,60	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(Z)-2-Trideceno	1315	47,30	99,90	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Autor da tese, 2012.

Tabela 3 – Compostos Orgânicos Voláteis identificados por CG/EM em amostras raças de bovinas

(Continuação)

COMPOSTO	Índice de Kovats	QUANTIDADE (ng)									
		GIROLANDO		HOLANDESA		PARDO SUÍÇO		GIR		NELORE	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
3,6-Dimetildecano	1317	39,93	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)- 3,7-dimetil-2,6-octadienoato de metila	1323	11,79	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Limoneno	1325	169,08	365,36	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Metoxibenzoato de metila	1340	-	24,46	-	-	-	1,66	15,97	-	0,84	-
Acetato de Citronelila	1357	4,34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Ciclogeraniol	1361	1,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cis-4-Isopropenil-1-metil-7-Oxabiciclo[4,1,0]-heptan-2-ona	1363	99,97	-	-	1,70	-	-	-	-	-	-
4-Butil-2-metiloctano	1369	16,74	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,8-Dimetilnonanol	1382	23,31	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dodecan-3-one	1386	22,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetradecano	1399	18,94	-	-	-	-	7,03	-	-	-	-
(E)-9-Dodecenal	1404	25,48	-	-	482,22	-	-	-	-	-	-
2-Etil-1,4-dimetilbenzeno	1411	2,92	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butirato de 2-feniletila	1439	7,01	84,07	20,93	5,30	1,30	12,46	162,85	3,15	14,25	681,79
4-Etilbenzaldeido	1455	-	44,70	-	-	-	7,96	44,25	1,04	5,14	167,72
11-Dodecen-1-ol	1466	-	-	-	4,09	-	-	-	-	-	-
8,14-Cedranóxido	1540	2,98	172,55	15,50	-	0,89	22,54	195,14	2,61	23,19	463,96
(E,E)-1,5-Dimetil-8-(1-metiletilideno)-1,5-ciclodecadieno	1559	-	66,69	9,06	-	1,56	7,48	58,70	0,81	7,94	116,77

Fonte: Autor da tese, 2012.

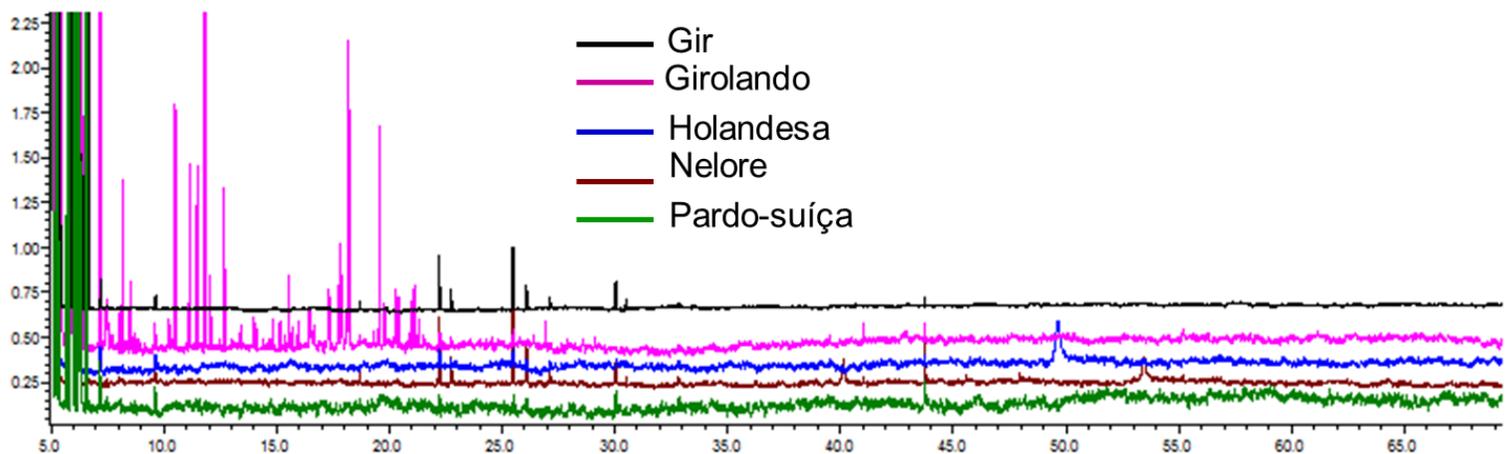
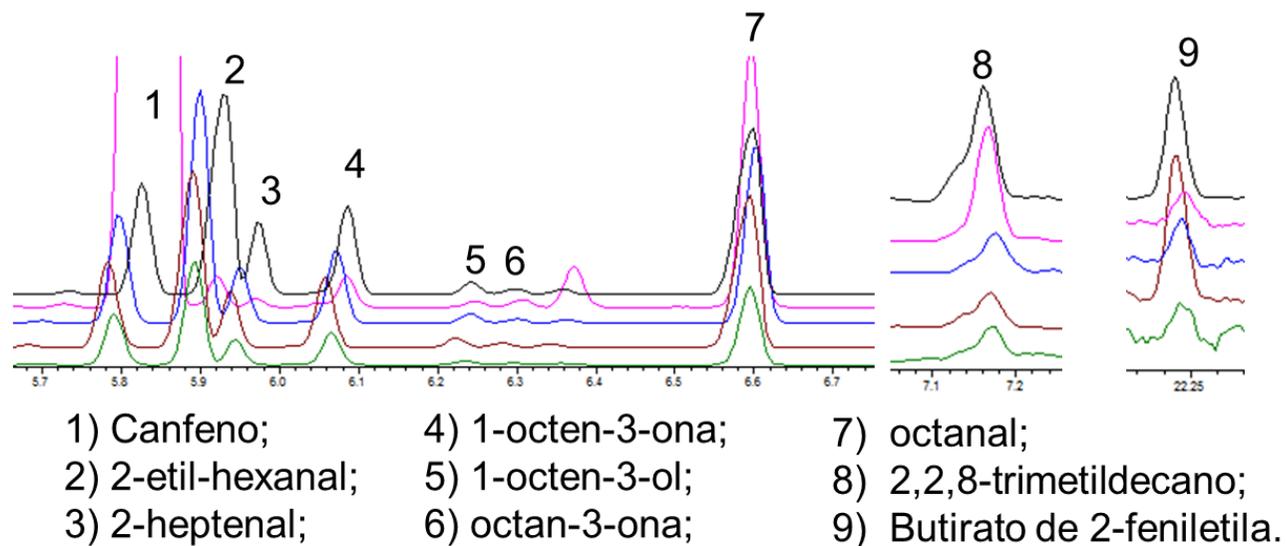
Tabela 3 – Compostos Orgânicos Voláteis identificados por CG/EM em amostras raças de bovinas

(Continuação)

COMPOSTO	Índice de Kovats	QUANTIDADE (ng)									
		GIROLANDO		HOLANDESA		PARDO SUÍÇO		GIR		NELORE	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Octanedioato dietila	1586	10,35	-	-	512,59	-	-	-	-	-	-
Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico	1592	-	29,91	7,99	-	-	2,11	22,81	0,49	1,74	58,45
1-Hexadeceno	1593	-	-	-	-	-	-	2,87	-	-	-
(Z)-3-Hexenil fenilacetato	1631	-	-	-	427,12	-	-	-	-	-	-
Cubenol	1641	-	-	-	2,68	-	-	-	-	-	-
1,4- α -Dimetil-7-(1-metiletilideno)-decaidronaftalen-1-ol	1691	-	186,71	-	6,5	5,35	8,05	77,75	1,47	4,04	17,15
Benzeno	1709	-	72,66	-	402,79	-	2,51	28,18	0,76	1,47	-
Acetato de (E)-7-tetradecenila	1797	-	-	3,80	-	0,28	3,09	-	0,13	-	-
(Z)-12-Hexadecenal	1816	-	-	-	402,95	-	-	-	-	-	-
6,10,14-Trimetilpentadecano-2-ona	1849	-	-	-	345,53	-	-	-	-	-	-
(E)-4-Hexadecen-1-ol	1868	-	-	-	368,68	-	-	-	-	-	-
Acetato de (Z)-7-hexadecenila	1988	-	-	-	482,22	-	-	-	-	-	-
10-Undeceno-1-ol	2064	-	40,11	-	5,30	-	-	-	-	-	-
Pentacosano	2073	-	711,27	-	-	-	-	-	-	-	-
Octacosano	2079	-	838,91	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato de (Z,E)-11,13,15-hexadecatrienila	2088	-	51,67	-	-	-	-	-	-	-	-
1,4-Di-hidroxibenzeno	2099	-	-	-	4,09	-	2,57	-	-	-	-
2,3,4,5,6-Pentaclorofenol	2137	-	-	-	-	-	3,52	-	-	-	-

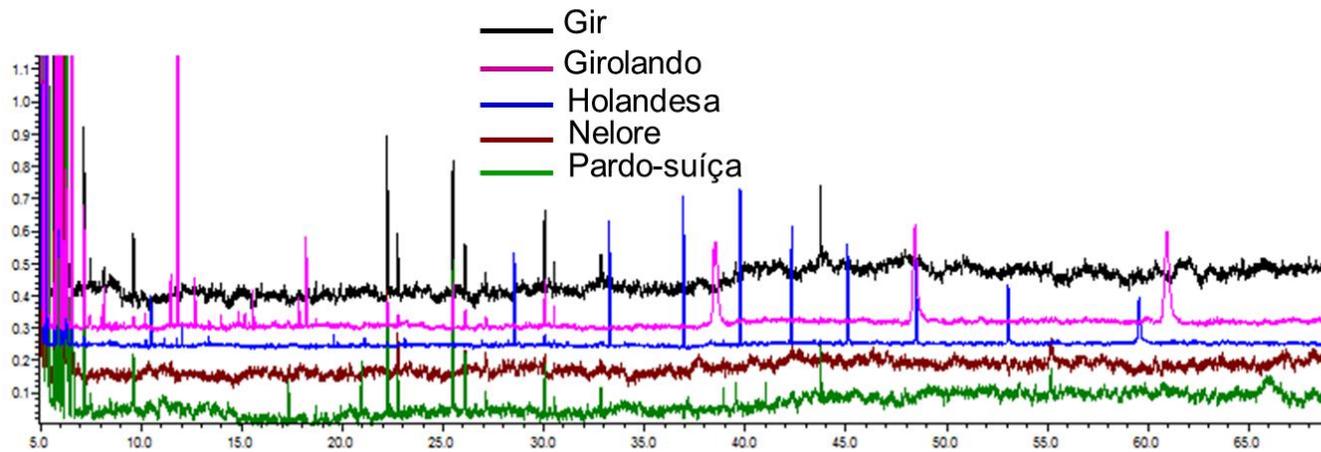
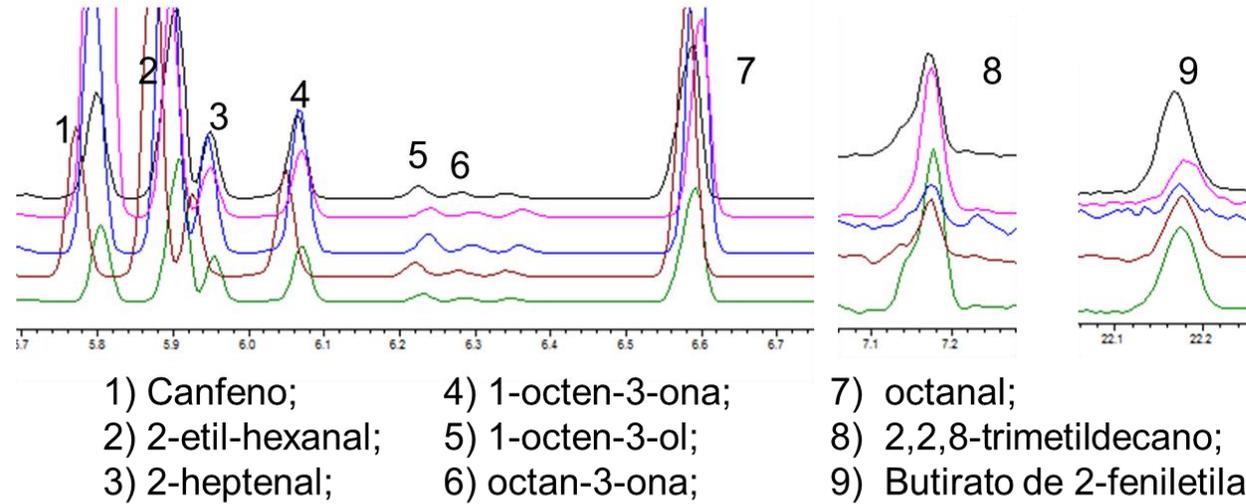
Fonte: Autor da tese, 2012.

Figura 26 – Identificação de COVS comuns em fêmeas de cinco raças bovinas



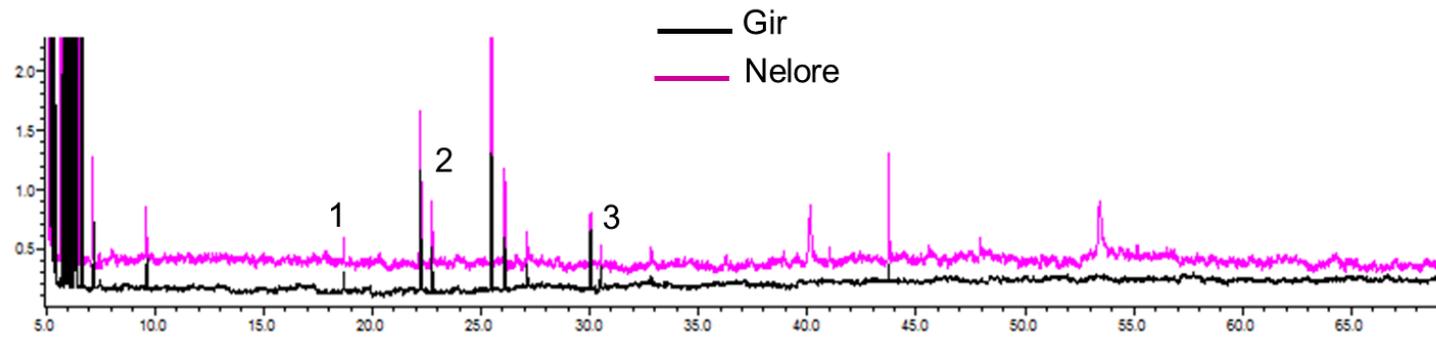
Fonte: Autor da tese, 2012.

Figura 27 – Identificação de COVS comuns em machos de cinco raças bovinas

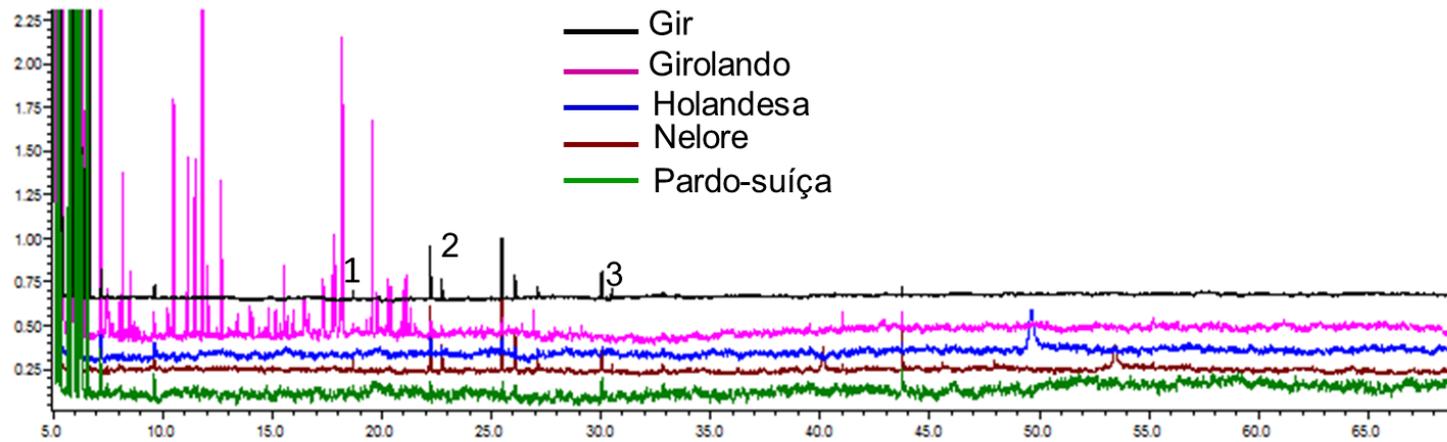


Fonte: Autor da tese, 2012.

Figura 28 – Identificação de COVS comuns apenas em fêmeas das raças indianas



1) 2-metoxibenzoato de metila; 2) 4-etilbenzaldeído e 3) benzeno

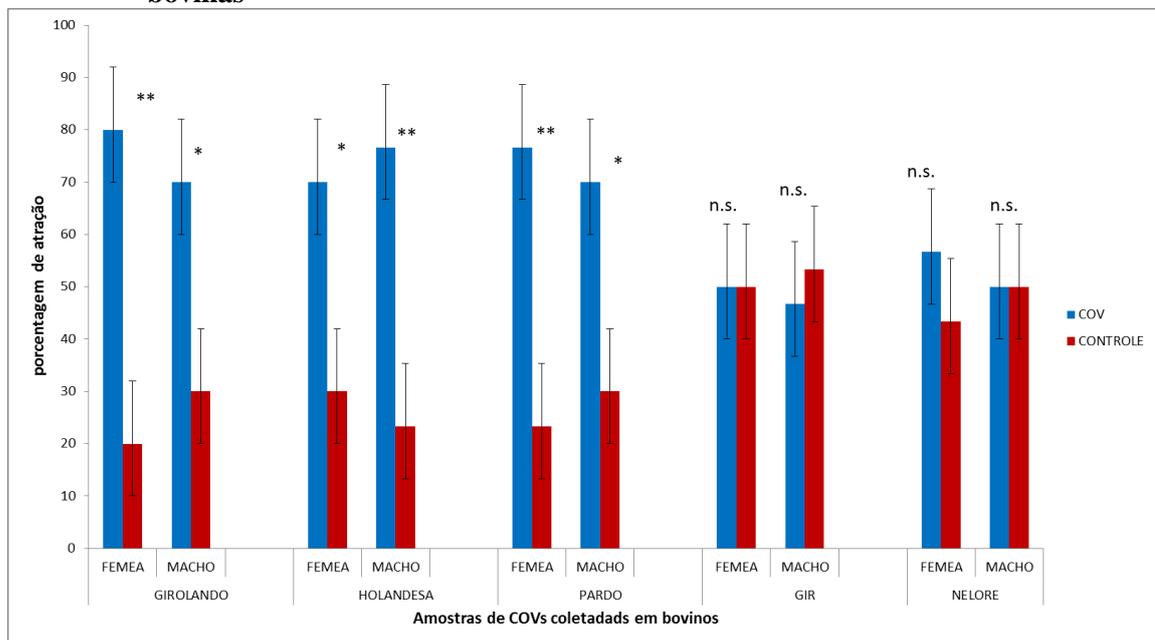


Fonte: Autor da tese, 2012

5.5 Bioensaios comportamentais com moscas-dos-chifres

A **figura 29** mostra os resultados dos bioensaios comportamentais realizados com moscas-dos-chifres e o material obtido por aeração dos animais. O teste visava observar a frequência de atração da mosca pelas amostras oriundas dos bovinos. Esses resultados foram obtidos de acordo com o teste do qui-quadrado (χ^2).

Figura 29 – Bioensaios comportamentais da mosca-dos-chifres em relação aos COVs de raças bovinas



Asteriscos indicam que as amostras foram significativamente diferentes (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$); n.s. não significativas

Fonte: Autor da tese, 2012.

A **figura 29** mostra que houve atração das moscas-dos-chifres para amostras da raça Girolando ($P < 0,01$ e $P < 0,05$, respectivamente, para fêmeas e machos). Os testes de olfatométrica também mostraram que as moscas são atraídas pelos COVs das amostras de fêmeas e machos da raça Holandesa ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Porém, nesse caso, os COVs dos machos foram mais atraentes do que os das fêmeas. Os resultados obtidos com os bioensaios, utilizando-se os COVs da raça Pardo Suíço foram semelhantes àqueles obtidos com a raça Girolando. Para as raças Gir e Nelore, verificou-se que elas não apresentaram compostos com efeito atraente para mosca-dos-chifres, ou seja, as moscas-dos-chifres não foram atraídas pelos odores dos animais dessas raças, nesse estudo.

A variação de COVs provenientes das raças bovinas detectada nesta pesquisa também foi constatada em outros estudos. Dentre eles podem ser citados: benzeno, 2-heptanona, dodecano, 1-octeno-3-ol, octanal, dentre outros (SPINHIRNE et al., 2004; CAI et al., 2006; CIGANEK & NECA, 2008). Essas substâncias podem ser responsáveis pela dinâmica comportamental de ectoparasitas. Os compostos como: α -pineno, mirceno, limoneno, canfeno, identificados neste estudo, normalmente presentes nos voláteis de vegetais (SCHOSSLER et al., 2009), também foram relatados em animais como o veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) (BURGER, 2005).

Os compostos canfeno, 2-etil-hexanal, 2-heptenal, 1-octen-3-ona, 1-octen-3-ol, octan-3-ona, octanal, 2,2,8-trimetildecano e butirato de 2-feniletila, por estarem presentes em todas as raças em estudo, evidenciaram que são compostos orgânicos voláteis comuns ao gênero *Bos*. Já as substâncias 2-metoxibenzoato de metila, 4-etilbenzaldeído e benzeno, que apareceram nas amostras de fêmeas de raças indianas e, em quase todos os bovinos machos indianos, podem ser possíveis repelentes das moscas-dos-chifres. Esse resultado corrobora com as informações da literatura especializada à qual revela que a mosca-dos-chifres tem preferência por bovinos de raças europeias (*Bos taurus*), mestiços e animais que possuam pelagem ou manchas escuras (BIANCHIN & ALVES, 2002).

Dentre todos os compostos identificados, o 1-octen-3-ol é citado por ser liberado por mamíferos, como fonte atrativa de alguns insetos hematófagos (TORRES-ESTRADA & RODRÍQUEZ, 2003) e, segundo Birkett et al. (2004), esse composto atrai moscas, mesmo em concentrações muito baixas. A menor concentração deste composto neste trabalho, que foi de 1,45 ng, para a amostra de macho da raça Nelore. Além disso, está presente em todas as raças avaliadas, podendo ser indicado na composição de iscas atrativas para o controle da mosca-dos-chifres em bovinos. O 1-octen-3-ol já foi usado em iscas atrativas para tabanídeos (Díptera: Tabanidae), conhecido popularmente no Brasil como “mutuca”, tendo como hospedeiros os animais domésticos e o homem. Esse composto também é usado em iscas atrativas para *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae) (MBOERA et al, 2000; KRCMAR et al., 2010).

Os bioensaios com olfatométria realizados no presente estudo indicaram que os voláteis liberados pelas raças bovinas Girolando (*Bos taurus x Bos indicus*), Holandesa e Pardo Suíça, ambas *Bos taurus*, influenciaram no comportamento da mosca-dos-chifres de busca de seu hospedeiro, independentemente do sexo do animal. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Doube (1984) o qual constatou que moscas do búfalo (*H. irritans exigua*) apresentam preferência por animais mestiços (Brahman x raça britânica), em

relação aos animais puros da raça Brahman (*Bos indicus*). Esses resultados evidenciaram, também, o efeito entre raças na preferência do inseto pelo seu hospedeiro. A preferência da *H. irritans* por animais bovinos europeus e animais oriundos de cruzamento entre raças, revelada na **figura 29**, estão de acordo com Krijgsmans & Windred (1933). Esses autores evidenciaram a maior preferência da mosca-do-búfalo (*Haematobia irritans exigua*) por animais da raça Holandesa, seguida do zebu e búfalo.

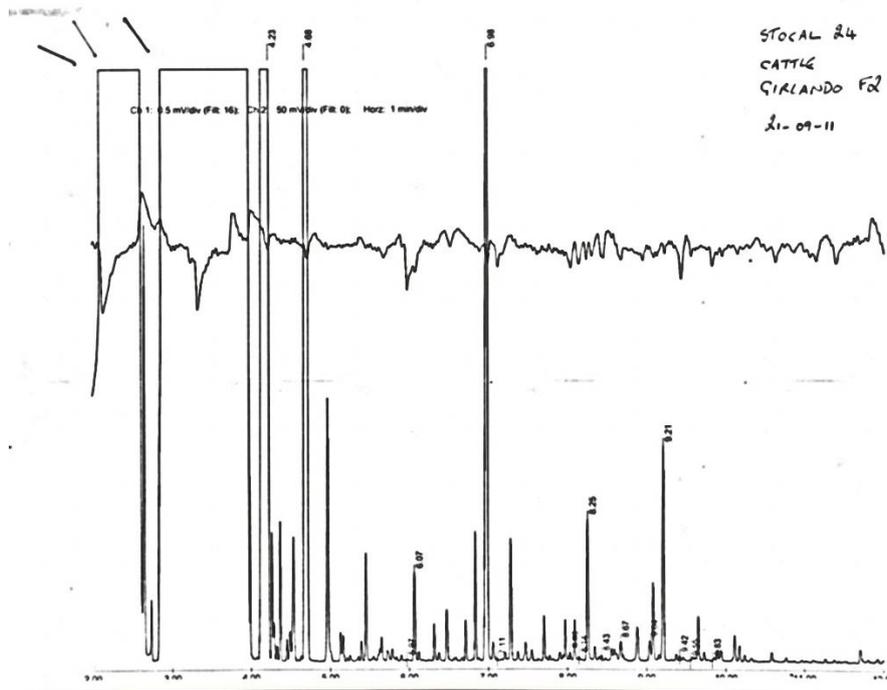
Os resultados mostram que a mosca *H. irritans* é atraída pelos odores provenientes dos animais bovinos e que existe diferença significativa entre as raças. Raças bovinas provenientes da espécie *Bos indicus* são menos suscetíveis. Porém, o efeito de sexo do animal não se demonstrou evidente. Apesar da diversidade de compostos orgânicos voláteis existentes neste trabalho, pode-se indicar alguns compostos como prováveis atraentes deste ectoparasita, entre eles, o 1-octen-3-ol, o qual é bastante estudado, sendo considerado como um potencial atrativo de uma variedade de dípteros hematófagos.

5.6 Análise de CG/EAG (realizado na Inglaterra) do extrato da raça Girolando fêmea frente a *S. calcitrans*

Os compostos com os quais a mosca-do-estábulo apresentou estímulo, quando confrontada com a mistura de COVs do bovino Girolando fêmea, foram os seguintes: mirceno, limoneno, acetato de butil e 2-heptanona (**Figura 30**, pág. 72).

O limoneno é de rápida evaporação e é conhecido como um veneno de contato (neurotóxico), atuando no aumento das atividades dos nervos sensoriais, causando hiperexcitabilidade nos nervos motores e conseqüentemente leva à convulsão e à paralisia. Apresenta eficácia em ectoparasitas de animais domésticos (MENEZES, 2005). O mirceno foi encontrado em três espécies de eucalipto, quando estas foram analisadas em cromatografia gasosa e apresenta atividade acaricida contra o carrapato bovino (CHAGAS et al., 2002). O acetato de butila apresentou 100% de mortalidade contra cinco pragas de grãos armazenados, quando aplicada na dosagem de 100 mg/L^{-1} (RAJENDRAN & MURALIDHARAN, 2005). A utilização de 2-heptanona em bioensaios comportamentais com abelhas (*Apis mellifera*, L.) mostrou repelência. Na presença dessa substância as abelhas paravam de coletar o xarope existente em placas de Petri (MALERBO-SOUZA & NOGUEIRA-COUTO, 1998). Estes compostos estão presentes na COVs como mostrado na **figura 30**.

Figura 30 – Compostos voláteis que indicam atividade da *S. calcitrans*



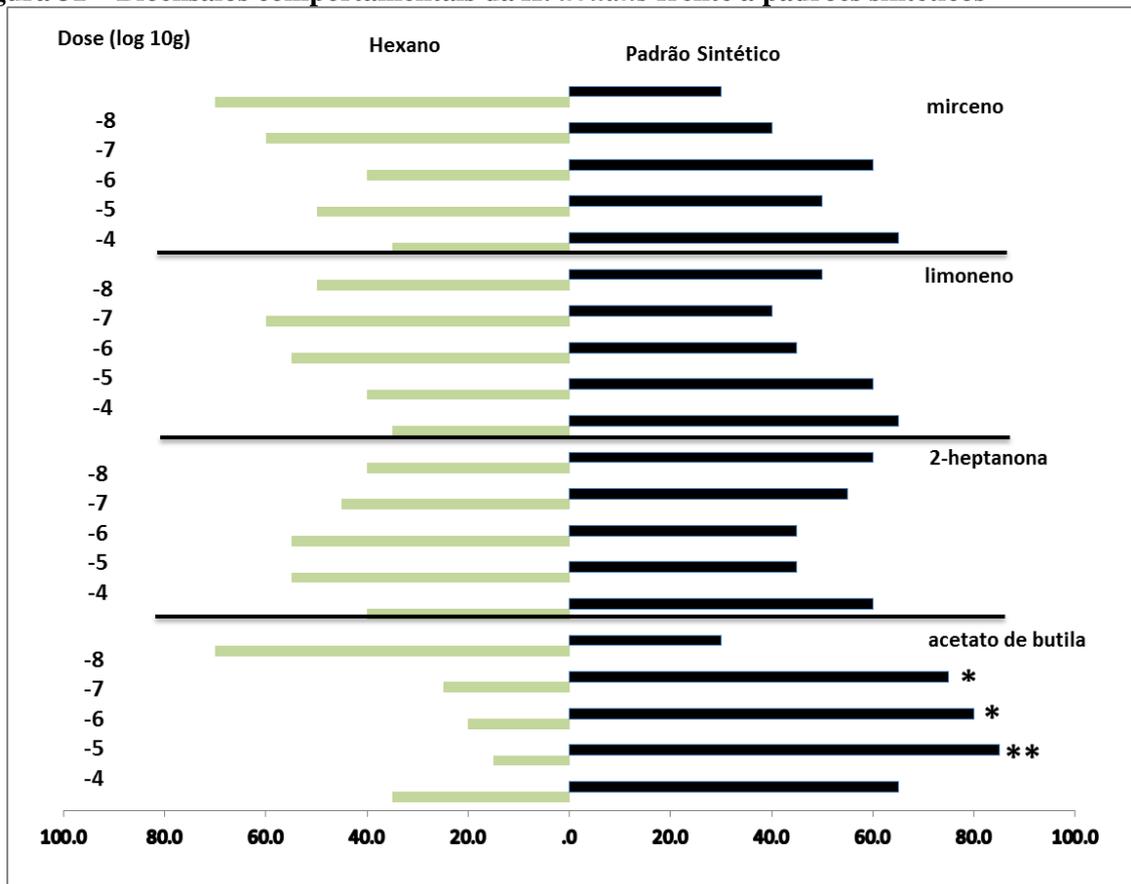
Fonte: BIRKETT, 2011.

5.7 Bioensaios comportamentais com moscas-dos-chifres frente aos compostos no CG/EAG

Assim que a mosca foi liberada no braço maior do olfatômetro apresentava diversos comportamentos como: andar ou voar em direção às fontes emissoras de odores, com uma provável detecção do odor ela passava a balançar as antenas e as asas, assim como realizar uma espécie de autolimpeza, onde passava os membros dianteiros na boca. Ao chegar à fonte de odor (padrão sintético), ela passava a caminhar sobre o papel de filtro, como estivesse em busca de algo. Dentre todos os bioensaios realizados, no total de 400, apenas duas moscas ficaram imóveis no momento em que foram liberadas. Uma provável explicação para tal comportamento pode estar ligada ao limite de estresse das mesmas ou sua alimentação insuficiente para enfrentar as mudanças de seus hábitos, no momento da captura.

A escolha pelo estímulo olfativo, compostos sintéticos, mostra ter uma grande variedade de respostas **figura 31** (pág. 73).

Figura 31 – Bioensaios comportamentais da *H. irritans* frente a padrões sintéticos



Asteriscos indicam que as amostras foram significativamente diferentes (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$)

Fonte: Autor da tese, 2012.

As avaliações realizadas com olfatômetro em Y para observar o comportamento das moscas-dos-chifres frente aos compostos padrões, mostraram que apenas o composto acetato de butila nas concentrações de 10^{-7} mg/mL e 10^{-6} mg/mL foram significantes a 0,05% e que na concentração de 10^{-5} mg/mL houve significância a 0,01% e que as demais concentrações deste composto e todas do outros compostos sintéticos testados não produziram efeitos estatisticamente significativos, ou seja, a amostra apresentou pouca ou nenhuma atração tanto para o padrão quanto para o controle.

Segundo Sant'Ana & Stein (2001), os bioensaios comportamentais podem sofrer interferência dos fatores exógenos e endógenos, como mudança de temperatura, horário de avaliação, idade do inseto, alimentação, sexo, dentre outras mais, que, possam afetar o comportamento do inseto. De acordo com Girón-Pérez et al. (2009) a atração dos insetos pela fonte estimulante pode estar condicionada ao tipo de substrato fornecido ou pelos fatores ambientais no horário no qual foi avaliada sua resposta olfativa.

Em alguns casos percebeu-se que os bioensaios realizados com os insetos machos demoravam mais que com as fêmeas. Eles pareciam mais indecisos na escolha e, quando optavam pela fonte de odor do composto padrão, em sua maior parte, andavam lentamente como se ainda estivessem indecisos, porém as fêmeas quando provavelmente percebiam o odor iam rapidamente à fonte.

As respostas obtidas nos bioensaios comportamentais para os compostos mirceno, limoneno e 2-heptanona podem ser consideradas como respostas negativas, ou compostos que provocam repulsão, aquelas que descrevem a redução das respostas locomotoras aos estímulos emitidos pela fonte. Já o acetato de butila, em algumas concentrações, pode ser considerado como composto de atração ou respostas positivas, que são aquelas que aumentam as respostas quando o organismo receptor vai ao encontro da fonte emissora (EIRAS & MAFRA NETO, 2001).

O acetato de butila também mostrou resposta comportamental atrativo em abelhas *Apis mellifera* sendo este composto colocado em um chumaço de algodão, e o chumaço de algodão era pendurado em frente à colmeia, induzia que elas saíssem de sua colônia (WAGER & BREED, 2000). Cha et al. (2011) revelam que esse composto tanto funciona como um antagonista sobre o comportamento de vôo da mosca do Espinheiro Rei (*Crataegus viridis*) como também influencia no comportamento agonista no vôo da mosca do Mirtilo (*Crataegus brachyacantha*).

5.8 Diferenças dos COVs entre os grupos genéticos estudados

As análises de CG/EM foram realizadas sobre os voláteis dos animais das cinco raças de bovinos. Estas análises revelaram que, no geral, 105 diferentes compostos químicos voláteis foram detectados. Verificou-se que houve diferença nos COVs entre as raças e sexos estudados (**Tabelas 4 e 5**, pág. 75). O número de compostos revelados nos animais machos variou de 18 (na raça Nelore) a 49 (na raça Girolanda) e nas fêmeas de 14 (Pardo-Suíça) a 63 (Girolanda). Verifica-se a variação existente entre as raças e entre sexos em relação ao percentual de COVs em relação à sua origem.

Tabela 4 – Variação no número de compostos orgânicos voláteis liberados por fêmeas de cinco raças de bovinos e percentuais em relação à sua origem

Raças	COVs DAGs ¹ (%)	COVs Aromáticos (%)	COVs Terpenos (%)	Total
Girolanda	30 (47,62)	16 (25,40)	17 (26,98)	63
Holandesa	10 (62,50)	2 (12,50)	4 (25,00)	16
Pardo-Suíça	10 (71,43)	1 (7,14)	3 (21,43)	14
Gir	10 (50,00)	5 (25,00)	5 (25,00)	20
Nelore	10 (55,55)	5 (27,78)	3 (16,67)	18

¹DAG: Derivados de ácidos graxos

Fonte: Autor da tese, 2012.

Tabela 5 – Variação no número de compostos orgânicos voláteis liberados por machos de cinco raças de bovinos e percentuais em relação a sua origem

Raças	COVs DAGs ¹ (%)	COVs Aromáticos (%)	COVs Terpenos (%)	Total
Girolanda	25 (51,00)	15 (30,61)	9 (18,37)	49
Holandesa	19 (55,88)	6 (17,65)	8 (23,53)	34
Pardo-Suíça	15 (60,00)	7 (28,00)	3 (12,00)	25
Gir	11 (52,38)	6 (28,57)	4 (19,05)	21
Nelore	11 (61,11)	3 (16,67)	4 (22,22)	18

¹DAG: Derivados de ácidos graxos

Fonte: Autor da tese, 2012.

A identificação de grupos realizada pelo método de agrupamento proposto por Tocher possibilitou a divisão das cinco raças em 2 grupos (**Tabela 6 e Figura 32**, pág 76) para os animais machos. O grupo I foi formado por quatro raças (Girolanda, Holandês, Pardo-Suíça e Gir) e o outro grupo formado apenas por uma raça, a Nelore. É esperado que as raças apresentem alta similaridade dentro de cada grupo e alta dissimilaridade entre raças de grupos diferentes. Já em relação aos animais fêmeas, o agrupamento proposto por Tocher possibilitou a divisão das cinco raças em dois grupos distintos (**Tabela 7**, pág. 76 e **Figura 33**, pág. 77). O primeiro grupo foi formado pelas raças Girolando, Pardo-Suíça, Nelore, Holandês e o outro grupo formado apenas pela Gir. Constata-se que houve diferença na formação dos grupos entre machos e fêmeas.

Tabela 6 – Agrupamento estabelecido pelo método de Tocher entre cinco raças de bovinos avaliados para 18 compostos orgânicos voláteis emitidos por indivíduos machos

Grupo	Raças
I	Girolando, Holandês, Pardo-Suíça, Gir
II	Nelore

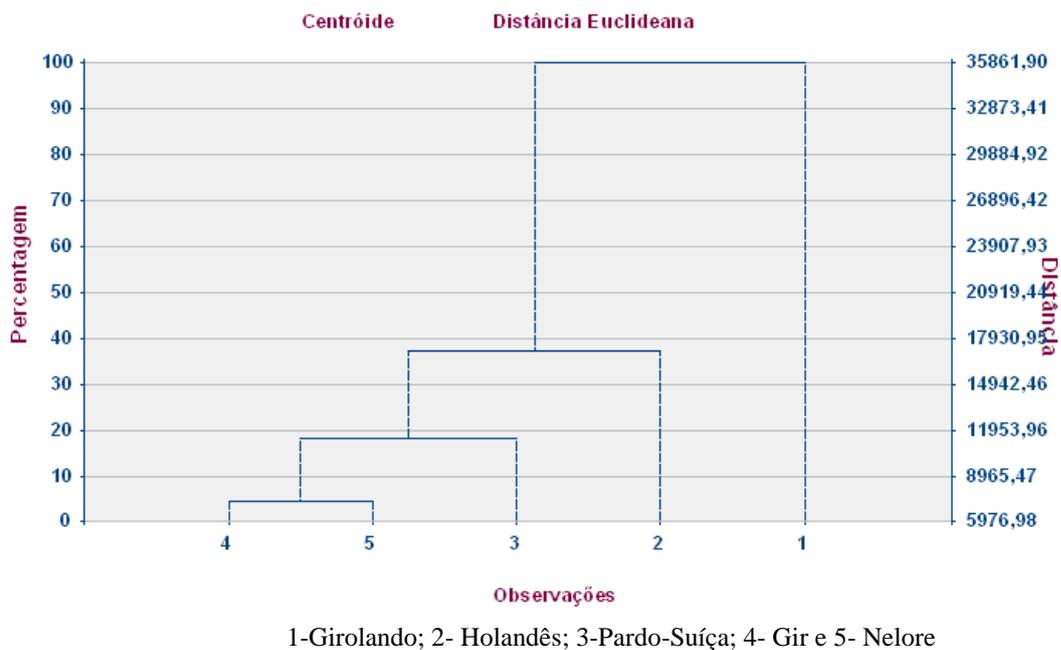
Fonte: Autor da tese, 2012.

Tabela 7 – Agrupamento estabelecido pelo método de Tocher entre cinco raças de bovinos avaliados para 15 compostos orgânicos voláteis emitidos por indivíduos fêmeas

Grupo	Raças
I	Girolando, Holandês, Pardo-Suíça, Nelore
II	Gir

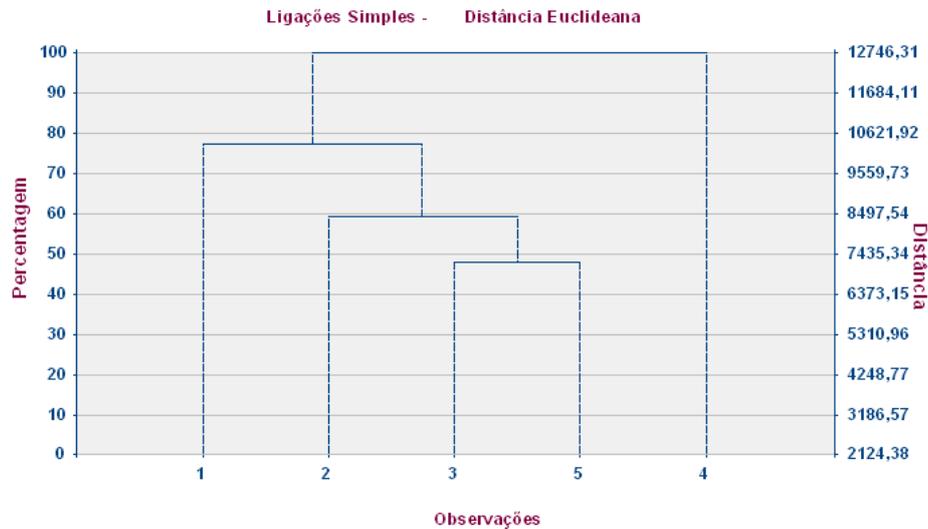
Fonte: Autor da tese, 2012.

Figura 32 – Dendrograma representativo da similaridade entre raças de bovinos considerando os voláteis liberados por machos



Fonte: Autor da tese, 2012.

Figura 33 – Dendrograma representativo da similaridade entre raças de bovinos considerando os voláteis liberados por fêmeas



1-Girolando; 2- Holandês; 3-Pardo-Suíça; 4-Nelore e 5- Gir

Fonte: Autor da tese, 2012.

Nas **Tabelas 8 e 9** encontra-se a contribuição das variáveis, picos dos COVS, em relação a discriminação entre os grupos estabelecidos. Verificou-se que, para os animais machos, cinco compostos contribuiram para discriminar um grupo do outro: picos 3, 5, 8, 9 e o 16. O pico que mais contribuiu foi o pico 3 com 40 % (**Tabela 8**). Para as fêmeas, apenas três compostos foram suficientes para discriminar as raças. Os Picos 1 e 8, com 50 e 40 %, respectivamente, foram os responsáveis pela diferenciação dos grupos (**Tabela 9**).

Tabela 8 – Contribuição (%) das variáveis para diferenciação das raças (machos)

Variável (Pico)	COV do pico	Contribuição (%)
Pico 3	Canfeno	40
Pico 5	2-Heptenal	10
Pico 8	3-Octanona	20
Pico 9	Octanal	20
Pico 16	Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico	10

Fonte: Autor da tese, 2012.

Tabela 9 – Contribuição (%) das variáveis para diferenciação das raças (fêmeas)

Variável (Pico)	COV do pico	Contribuição (%)
Pico 1	Canfeno	50
Pico 6	3-Octanona	10
Pico 8	2,2,8-Trimetildecano	40

Fonte: Autor da tese, 2012.

Os resultados obtidos mostram que os COVs emitidos pelas diferentes raças bovinas podem ser usados para aumentar a eficácia de agentes de controle biológico, abrindo novas estratégias ecológicas para combater parasitos dos animais. Estudos envolvendo diferentes raças e a descendência dos cruzamentos obtidos entre as mesmas contribuirão para maior entendimento do efeito de raça na emissão de COVs e a susceptibilidade/resistência dos bovinos aos parasitas.

Com relação às diferenças de resistências dos bovinos aos ectoparasitas ALENCAR et al., (2005) revelam que além de apresentar mecanismos de defesa desses hospedeiros, como lambadura, roçadura ou ato de se coçar, tentando livrar-se das larvas, no caso do carrapato, ainda serem pouco conhecidos, existe o efeito de indivíduos dentro e entre raças diferentes.

Possivelmente, possam apresentar resistência aos parasitas por meio da emissão de compostos existentes em sua alimentação, respiração ou suor. Sendo assim, esses compostos ou a mistura desses com outros podem repelir as moscas, de acordo com sua concentração. Esses fatores, intrínsecos a cada animal, em conjunto com outros vão determinar o efeito genético de cada indivíduo, e de cada grupo racial. De forma que, partes dessas peculiaridades de cada indivíduo poderão ser transmitidas de geração em geração. Seja nos acasalamentos entre os indivíduos de uma mesma raça ou entre raças diferentes.

O grupo genético Girolando, demonstrou ser susceptível à mosca-dos-chifres no presente estudo. Provavelmente, pela maior contribuição, na sua formação, da raça Holandesa, que também é considerada susceptível ao ataque dessa mosca.

A **figura 32** mostra que, para os machos, a divergência genética entre as raças indicou que Girolanda, Holandês, Pardo-Suíça e Gir são mais próximas entre si, enquanto que a Nelore formou um grupo isolado das demais. Já para as fêmeas as raças Girolando, Pardo suíço, Nelore, Holandês foram mais similares, do que a raça Gir a qual formou um agrupamento separado das demais (**Figura 33**). A raça Nelore mostrou-se mais distante geneticamente em relação ao grupo I, porém ela está mais próxima à raça Gir, que pode estar relacionado a algumas características pertencentes à subespécie da qual elas fazem parte que é *Bos taurus indicus* e as demais raças pertencem à subespécie *Bos taurus taurus*.

6 CONCLUSÕES

O armazenamento dos ovos em laboratório dentro da câmara de refrigeração propiciou uma maior quantidade de moscas emergidas. Porém para uma criação artificial de moscas-dos-chifres em laboratório, será necessário a implantação de um sistema alimentar visando modelos dessa ectoparasita.

A metodologia aplicada à coleta de compostos voláteis em animais mostrou-se eficiente, já que todos os perfis cromatográficos realizados com animais fêmeas da raça Pardo-Suíça mostraram pouca ou quase nenhuma diferença em relação à composição química das amostras analisadas.

O acetato de butila foi o único composto sintético capaz de exercer uma maior atração para a *H. irritans*.

Identificações de compostos orgânicos voláteis oriundos de animais através de técnicas cromatográficas e bioensaios comportamentais usando esses compostos são fundamentais para descobertas de novos meios de controle de ectoparasitas, como a mosca-dos-chifres.

Os compostos orgânicos voláteis emitidos pelas raças europeias exerceram efeito atrativo sobre a mosca-dos-chifres nos bioensaios comportamentais. Enquanto que os COVs das raças zebuínas não apresentaram atração.

As raças europeias como são geneticamente mais próximas mostram um maior grau de similaridades dos compostos orgânicos voláteis do que as raças zebuínas.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo da utilização de semioquímicos no controle de insetos que infestam animais ainda é um assunto muito novo no Brasil. Para tanto é preciso realizar várias pesquisas que envolva o comportamento do inseto, a importância do inseto para o animal, elementos com poder de atrair o inseto ao seu hospedeiro, a reação do hospedeiro diante da alta infestação, as fases de desenvolvimento do inseto, momento para o ataque e outros. Enfim são muitos os aspectos a serem observados que podem contribuir com esse estudo.

Diante disso, a continuação destes estudos se faz necessária para que se possa desenvolver um método alternativo para o controle de mosca-dos-chifres. Sendo necessário ainda:

- Realizar bioensaios eletrofisiológicos com a *H. irritans*;
- Levar os resultados a campo através de armadilhas;
- Desenvolver um produto eficaz no controle destas moscas.

REFERÊNCIAS

- ABEYGUNAWARDENA, H.; DEMATAWEWA, C. M. B.. Pre-pubertal and postpartum anestrus in tropical Zebu cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 373–387, 2004.
- ALKOIRET, I. T.; et al. Reproductive performance and milk production of Girolando cows in the Ranch of Kpinnou, South-West of Benin Republic. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, n. 19, p. 2588-2592, 2011.
- ALMEIDA, F. A., et al. Dinâmica populacional da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) em bovinos da raça Guzerá e mestiço em Selvíria, MS. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 157-162, 2010.
- ALMEIDA, R.; et al. Estudo do efeito de fatores de meio ambiente Sobre as produções de leite, gordura e proteína em vacas da raça Pardo-Suíça no estado do Paraná. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 1, n. 1, p. 41-46, 2003.
- ANDRADE, A. J. Avaliação de cairomônios na atratividade de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Brejo do Mutambal, município de Varzelândia, MG. 2006. 176 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- ANGEL-SAHAGUN, C. A., et al. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (hyphomycetes). **Journal of Insect Science**, v. 5, p. 1-8, 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE ZEBU. Regulamento do serviço de registro genealógico das raças zebuínas / Editado por Luiz Antonio Josahkian - Uberaba, MG: ABCZ, 2010. 148p.
- AUGUSTO, F. **Cromatografia a Gás: Curso em Diapositivos**. Campinas, SP, 2000. 10 p. Disponível em <<http://chemkeys.com/br/2000/07/18/cromatografia-a-gas-curso-em-diapositivos/>>. Acesso em 10 de janeiro de 2012.
- BARROS, A. T. M. Desenvolvimentos de *Haematobia irritans* em massas fecais de bovinos mantidas em laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 217-221, 2002.
- BARROWS, W. M. The reactions of the pomace fly, *Drosophila ampeliphila* Loew, to odorous substances. **Journal of Experimental Zoology**, v. 4, p. 515–537, 1907.
- BAUTISTA, C. R., et al. Immunization of Bovines with Concealed Antigens from *Haematobia irritans*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1026, p. 284–288, 2004.
- BIANCHIN, I.; ALVES, R. G. O. Mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans*: comportamento e danos em vacas e bezerros Nelore antes da desmama. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 3, 109-113, 2002.

BIANCHIN, I., KOLLER, W. W.; DETMANN, E. Sazonalidade de *Haematobia irritans* no Brasil Central. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, 79-86, 2006.

BIRKETT, M.A.; et al. The role of volatile semiochemicals in mediating host location and selection by nuisance and disease-transmitting cattle flies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, p. 313–322, 2004.

BRATTOLI, M., et al. Odour Detection Methods: Olfactometry and Chemical Sensors. **Sensors**, v. 11, p. 5290-5322, 2011.

BRITO, L. G., et al. Mosca-dos-chifres: aspectos bio-ecológicos, importância econômica, interações parasito-hospedeiro e controle. Porto Velho: Embrapa Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia, 2005. (Comunicado Técnico, 302).

BRUCE, W. G. The history and biology of the horn fly *Haematobia irritans* (Linnaeus), with comments on control. **Technical Bulletin**, v. 157, 1964. 33p.

BURGER, B. V. Mammalian semiochemicals. **Topics in Current Chemistry**, v. 240, p. 231-278, 2005.

CAI, L.; et al.. Characterization of volatile organic compounds and odorants associated with swine barn particulate matter using solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry–olfactometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1102, p. 60–72, 2006.

CAMPOS, C. P.; et al.. Métodos de controle químico da mosca-dos-chifres. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano VI, n. 10, 2008, 8p.

CARVALHO, L. A.; et al. Formulação e avaliação de meio artificial para crescimento de larvas de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**, v. 6, p. 1-8, 2009.

CASTIGLIONI, L.; BICUDO, H. E. M. C. Molecular characterization and relatedness of *Haematobia irritans* (horn fly) populations, by RAPD-PCR. **Genética**, 124:11–21, 2005.

CERUTI, F. C. Interações entre feromônios de insetos e semioquímicos de plantas. **Revista Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 73-82, 2007.

CHA, D. H.; et al. Identification of Fruit Volatiles from Green Hawthorn (*Crataegus viridis*) and Blueberry Hawthorn (*Crataegus brachyacantha*) Host plants attractive to different phenotypes of *Rhagoletis pomonella* flies in the southern United States. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, n. 9, p. 974-983, 2011.

CHAGAS, A. C. S; et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n.5, p. 247-253, 2002.

CIGANEK, M.; NECA, J. Chemical characterization of volatile organic compounds on animal farms. **Veterinarni Medicina**, v. 53, n. 12, p. 641–651, 2008.

CRUZ, C. D. Programa Genes - **Diversidade Genética**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, v. 1, 2006, 278p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: Imprensa Universitária, 2004, 480p.

CRUZ-VÁZQUEZ, C.; et al. Presencia de *Haematobia irritans* (L)(Diptera:Muscidae) en ganado lechero estabulado de Aguascalientes, México: Informe preliminar. **Veterinaria México**, v. 30, n. 2, p. 205-208, 1999.

CRUZ-VÁZQUEZ, C., et al. Distribución anual de *Haematobia irritans* (L.) (Diptera:Muscidae) en tres establos lecheros de Aguascalientes, México. **Veterinaria México**, v. 31, n. 3, p. 195-199, 2000.

CUPP, M. S., et al. Salivary Gland Thrombostasin Isoforms Differentially Regulate Blood Uptake of Horn Flies Fed on Control- and Thrombostasin-Vaccinated Cattle. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 4, p. 610-617. 2010.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. **Química. Nova**, v. 25, n. 6a, p. 995-1002, 2002.

DELARIVA, R. L., AGOSTINHO, A.A. Introdução de espécies: uma síntese comentada. **Acta Scientiarum**, v. 21, n. 2, p. 255-262, 1999.

DOMINGUES, O. **Introdução à zootecnia**. 3ª ed., série didática, n. 5, 1968, 392p.

DOUBE, B. M. The effect of breed and coat colour on numbers of the buffalo fly *Haematobia irritans exigua* de Meijere, (Diptera, Muscidae) on bovine hosts. **Journal of the Australian Entomological Society**, v. 23, p. 39-45, 1984.

EDWARDS, J. F.; et al. Bovine Teat Atresia Associated with Horn Fly (*Haematobia irritans irritans* (L.))-induced Dermatitis. **Veterinary Pathology**, v. 37, p. 360-364, 2000.

EIRAS, A. E.; MAFRA NETO, A. Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento de insetos. In: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M. **Feromônio de insetos: biologia, química e emprego no manejo de praga**. 2ª ed., Ribeirão Preto-SP: Holos, 2001, cap. 3, p. 27-39.

FAO. FAO Statistical Bases (2009). Disponível em:
<<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> Acesso em: 12 dezembro em 2011.

FARIA, F. J. C.; et al. Estrutura genética da raça Gir mocha registrada no brasil. **Boletim de Indústria Animal**, v. 63, n. 3, p. 135-141, 2006.

FAZOLIN, M, ARGOLO, V. M., ESTRELA, J. L. V. **Criação massal do besouro africano para o manejo integrado da mosca-do-chifre**. Acre: Embrapa Agroflorestal do Acre, 1997. (Comunicado Técnico, 78).

FERREIRA, E. V.; DELLA LUCIA, T. M. C. **Feromônio de insetos: biologia, química e empregos no manejo de pragas**. 2ª 2ª ed., Ribeirão Preto-SP: Holos. 2001, 206p.

FERREIRA, J. T. D., CORRÊA, A. G., VIEIRA, P. C. **Produtos Naturais no controle de insetos**. EduFSCAR, (Série de textos da Escola de Verão em Química, v.III), 2001, 176 p.

GIKONYO, N. K.; et al. Odor composition of preferred (Buffalo and Ox) and nonpreferred (Waterbuck) hosts of some Savanna Tsetse flies. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 5, p. 969-981, 2002.

GIKONYO, N. K.; et al. Responses of *Glossina morsitans morsitans* to blends of electroantennographically active compounds in the odors of its preferred (Buffalo and Ox) and nonpreferred (Waterbuck) hosts. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 10, p. 2331-2345, 2003.

GIRÓN-PÉREZ, K.; et al. Atração de adultos de *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera: Curculionidae) a fragmentos vegetais em diferentes estados de observação. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 842-846, 2009.

GOMES, A. A., KOLLER, W. W., SILVA, R. L. Ocorrência de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) como vetor de *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) em Campo Grande, RS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 7, n. 1, 69-70, 1998.

GOMES, C. C. G., TRIGO, J. R.; EIRAS, A. E. Sex Pheromone of the American Warble Fly, *Dermatobia hominis*: The Role of Cuticular Hydrocarbons. **Journal of Chemical Ecology**, v.34, p. 636–646, 2008.

GONZALES, J. C. **O carrapato do boi**. 3ª edição, Ed. Passo Fundo: UFP, Rio Grande do Sul, 2003, 129p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, v. 37, p. 1-55, 2009.

JENSEN, K. M. V., et al. Variation in the load of the horn fly, *Haematobia irritans*, in cattle herds is determined by the presence or absence of individual heifers. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, 275–280, 2004.

JONSSON N. N., MAYER D. G. Estimation of the effects of buffalo fly (*Haematobia irritans exigua*) on the milk production of dairy cattle based on a meta-analysis of literature data. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 13, n. 4, p. 372-376. 1999.

KRCMAR, S.; MIKUSKA, A.; RADOLIC, V. Comparison of sampling tabanids (Diptera: Tabanidae) by four different potential attractants. **Journal of Applied Entomology**, v. 134, p. 608–613, 2010.

KRIJGSMAN, B. J.; WINDREDG, L. Investigations on the buffalo fly *Lyperosia exigua* de Meij. 1. The host preference of *L. exigua* (resume). **Pamphlet (Council for Scientific and Industrial Research)**, No. 43: 7-8, 1933.

KURAMOCHI, K. Ovipositional Behavior of the Horn Fly (Diptera: Muscidae) in the Field. **Journal of Medical Entomology**, v.37, n 3, p. 461-466, 2000.

LEITE, R. C., et al. First Report of *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) as Vector of *Dermatobia hominis* (L.jr.) (Diptera: Cuterebridae) in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 761-762, 1998.

LENSTRA, J. A. Marker-assisted conservation of European cattle breeds: an evaluation. **Animal Genetics**, v. 37, p. 475-481, 2006.

LEROY, P. D.; et al. The semiochemically mediated interactions between bacteria and insects. **Chemoecology**, v. 21, p. 113-122, 2011.

LIMA, L. G. F., PERRI; S. H. V. PRADO, A. P. Porcentagem de eclosão de ovos de *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) em laboratório. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 3, p. 478-483, 2010.

LOGAN, J. G., BIRKETT, M. A. Semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. **Pest Management Science**, v. 63, p. 647-657, 2007.

LYSYK, T. J., STEELMAN, C. D. Effect of Aggregation of Horn Fly Populations Within Cattle Herds and Consequences for Sampling to Obtain Unbiased Estimates of Abundance. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 4, p. 598-606, 2004.

MARKIN, G. P., YOSHIOKA, E. R. Biological Control of the Horn Fly, *Haematobia irritans* L., in Hawaii (Diptera: Muscidae). **Proceedings of the Hawaiian Entomological Society**, v. 33, p. 43-50, 1998.

MARQUES, D. C. et al. **Criação de Bovinos**. 6 ed., São Paulo: Nobel, 1981, 479p.

MARQUES, F. A. C., YAMAMURA, M. H., VIDOTTO, O. Lesões no couro bovino causadas pelos principais ectoparasitas nas regiões noroeste do estado do Paraná e sudoeste do estado do Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 21, n. 1, p. 33-39, 2000.

MBOERA, L. E. G. TAKKEN, W.; SAMBU, E. Z. The response of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to traps baited with carbon dioxide, 1-octen-3-ol, acetone, butyric acid and human foot odour in Tanzania. **Bulletin of Entomological Research**, v. 90, p. 155-159, 2000.

MCMANUS, C.; et al. Parâmetros reprodutivos para gado holandês em Confinamento total no centro-oeste do Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 272-283, 2008.

MENEZES, E. L. A. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola**. Seropédia: Embrapa Agrobiologia, 2005. (Documento, 205).

MOCHI, D. A., et al. Efficiency of entomopathogenic fungi in the control of eggs and larvae of the horn fly *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). **Veterinary Parasitology**, v. 167, p. 62-66, 2010.

MORAES, M. C. B.; et al. **Ecologia química aplicada ao controle de praga na agricultura** (Workshop – Teórica) 2011, 14p.

MORAES, M. C. B.; et al. **Eletrantenografia: a antena do inseto como um biossensor**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. (Documentos, 270).

MORAES, M. C. B.; et al. **Metodologia para estudos de semioquímicos e a sua aplicação no manejo de pragas. A influência de voláteis de soja no comportamento do parasitoide *Telenomus podisi***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. (Circular Técnica, 24).

MOREIRA, M. A. B., ZARBIN, P. H. G., CORACINI, M. D. A. Feromônios associados aos coleópteros-praga de produtos armazenados. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 472-477, 2005.

MORRIS, C. A. A review of genetic resistance to disease in *Bos taurus* cattle. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 481–491, 2007.

NASCIMENTO, R. R.; SANT'ANA, A. E. G. Isolamento e identificação dos semioquímicos de insetos sociais. In: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M. **Feromônio de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas**. 2ª ed., Ribeirão Preto – SP: Holos, capítulo 8, p. 65-71, 2001.

NAVARRO, D. M. A. F.; et al. Aspectos práticos relacionados ao uso do rincoforol, o feromônio de agregação da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum*. (Coleoptera: Curculionidae) no controle de pragas do coqueiro. Análise de sua eficiência em campo. **Química Nova**, v. 25, n.1, 32-36, 2002.

OLIVEIRA, A. A. A. Suscetibilidade da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) a inseticida nos tabuleiros costeiros de Alagoas, Bahia e Sergipe, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 2, p. 65-70, 2006.

OYARZÚN, M. P.; QUIROZ, A.; BIRKETT, M. A. Insecticide resistance in the horn fly: alternative control strategies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 22, p. 188–202, 2008.

OYARZÚN, M. P.; et al. Olfactory Response of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) to Cattle-Derived Volatile Compounds. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 6, 1320-1326, 2009.

OYARZÚN, M. P. A.; LI, Y.; FIGUEROA, C. C. High levels of insecticide resistance in introduced horn fly (Diptera: Muscidae) populations and implications for management. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 1, p. 258-265, 2011.

PEREIRA, M. A.; et al. **Cadeia produtiva do couro bovino: oportunidades e desafios**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2005. (Documentos, 153).

PINHEIRO, A. C., ALVES-BRANCO, F. P., SAPPER, M. F. M. **Efeito da infestação por *Haematobia irritans* no peso corporal de fêmeas da raça Hereford no RS.**, Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2001. (Circular Técnica, 23).

QUIROZ, R. H. **Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos**. México: Limusa., 1984.

RAJENDRAN, S.; MURALIDHARAN, N. Effectiveness of allyl acetate as a fumigant against five stored grain beetle pests. **Pest Management Science**, v. 61, p. 97–101, 2005.

REIS FILHO, J. C. **Endogamia na raça Gir**. 2006. 61f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2006.

SANT'ANA, J.; STEIN, K. Extração e identificação de substâncias bioativas de insetos. In: FERREIRA, J.T.B.; CORRÊA, A.G.; VIEIRA, P.C. **Produtos naturais no controle de insetos**. Editora da UFSCar, cap. 3, p. 47-74, 2001.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides – uma visão geral. Alimentos e Nutrição. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2007.

SARTORI, R. Manejo reprodutivo da fêmea leiteira. **Revista Brasileira de Produção Animal**, v. 31, n. 2, p. 153-159, 2007.

SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 244–250, 2011.

SBARBATI, A.; OSCULATI, F. Allelochemical Communication in Vertebrates: Kairomones, Allomones and Synomones. **Cells Tissues Organs**, v. 183, p. 206–219, 2006.

SCHOFIELD, S.; BRADY, J. Effects of carbon dioxide, acetone and 1 -octen-3-ol on the flight responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in a wind tunnel. **Physiological Entomology**, v. 22, p. 380-386, 1997.

SCHOSSLER, P.; et al. Volatile compounds of *Baccharis punctulata*, *Baccharis dracunculifolia* and *Eupatorium laevigatum* obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.20, n. 2, p. 277-287, 2009.

SERENO, F. T. P. S.; SERENO, J. R. B. Emergência de *Haematobia irritans* nas massas fecais de bovinos das raças Nelore e Pantaneira no Pantanal Mato-Grossense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 1705-1709, 1999.

SILVA NETTO, F.G., et al. **A mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia, 1991. (Documento, 23).

SILVA, A. M., et al. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p.1477-1482, 2010.

SILVA, M. V. G. B; et al. **Programa de melhoramento genético da raça Girolando sumário de touros resultado do teste de progênie - junho/2011**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2011. (Documentos, 148).

SPICER, P. E.; KEREU, R. K. Organochlorine insecticide residues in human breast milk: a survey of lactating mothers from a remote area in Papua New Guinea. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, p. 540-546, 1993.

SPINHIRNE, J. P.; KOZIEL, J. A.; CHIRASE, N. K. Sampling and analysis of volatile organic compounds in bovine breath by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, p. 63–69, 2004.

TANGTRAKULWANICH, K.; CHEN, H.; BAXENDALE, F. Characterization of olfactory sensilla of *Stomoxys calcitrans* and electrophysiological responses to odorant compounds associated with hosts and oviposition media. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, p. 327–336, 2011.

TORR, S. J.; MANGWIRO, T. N. C. Interactions between cattle and biting flies: effects on the feeding rate of tsetse. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 14, p. 400-409, 2000.

TORR, S. J.; MANGWIRO, T. N. C.; HALL, D. R. . The effects of host physiology on the attraction of tsetse (Diptera: Glossinidae) and *Stomoxys* (Diptera: Muscidae) to cattle . **Bulletin of Entomological Research**, v. 96, p. 71 – 84, 2006 .

TORRES, L. Functional genomics of the horn fly, *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758). **BMC Genomics**, v. 12, n. 105, p. 1-14, 2011.

TORRES-ESTRADA, J. L.; RODRÍGUEZ M. H. Señales físico químicas involucradas en la búsqueda de hospedeiros y en la inducción de picadura por mosquitos. **Salud Publica**, .v. 45, p. 497-505, 2003.

UNTALAN, P. M. Thrombostasin isoform frequency in a Central Texas field population of the horn fly, *Haematobia irritans*. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 359–366, 2006.

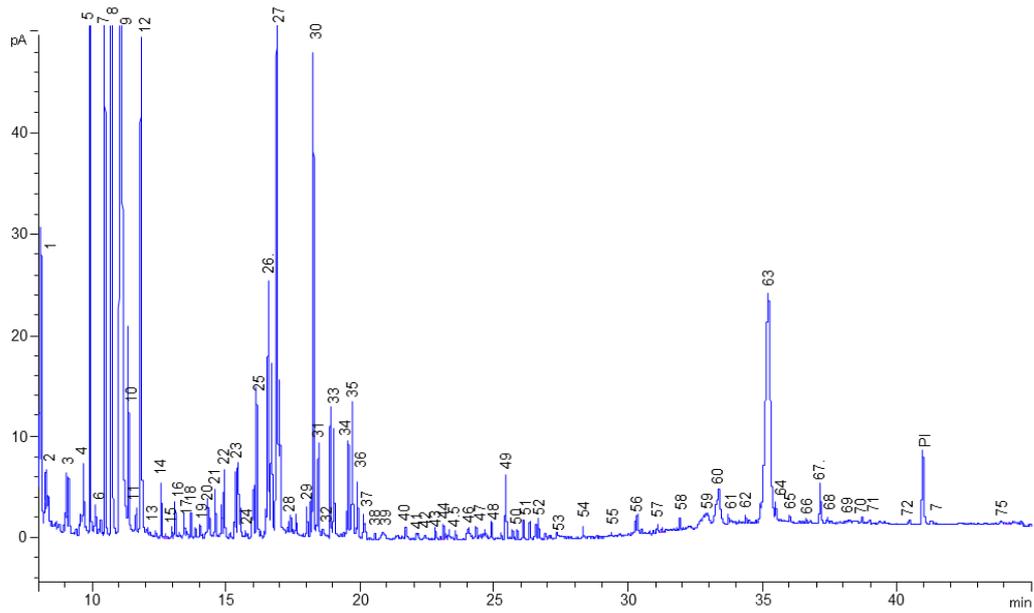
VALLE, E. R. **Boas práticas agropecuárias: bovinos de corte: manual de orientações**. 2. ed. Ver. e ampl.– Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2011.

WAGER; B. R.; BREED, M. D. Does Honey Bee Sting Alarm Pheromone Give Orientation Information to Defensive Bees?. **Annals of the Entomological Society of America**. v. 93, n. 6, p. 1329-1332, 2000.

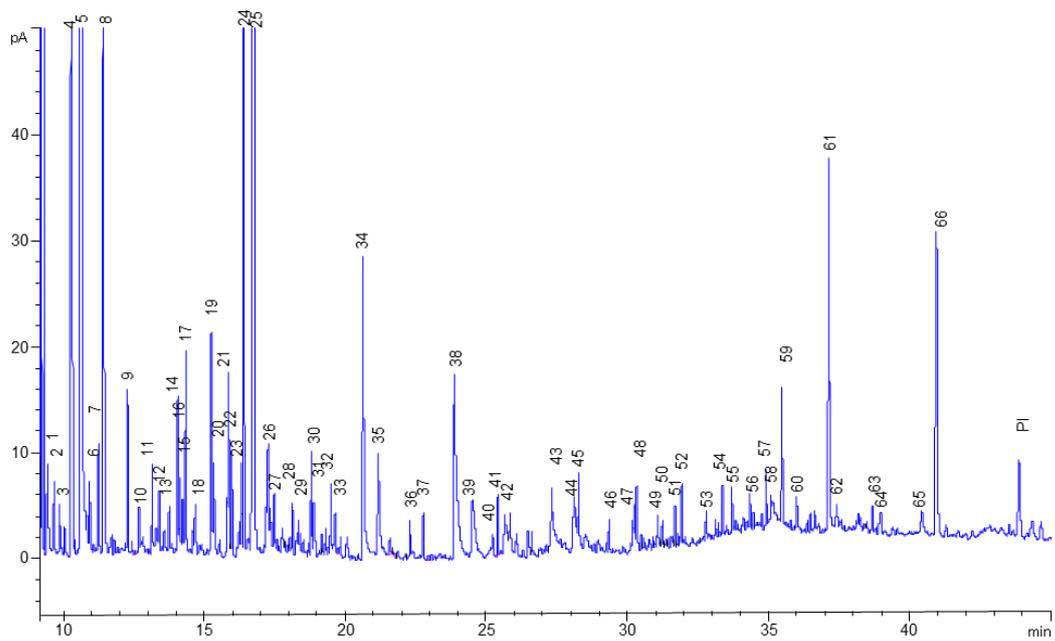
ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA, J. T. B.; LEAL, W. S. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 263-268, 1999.

APÊNDICES

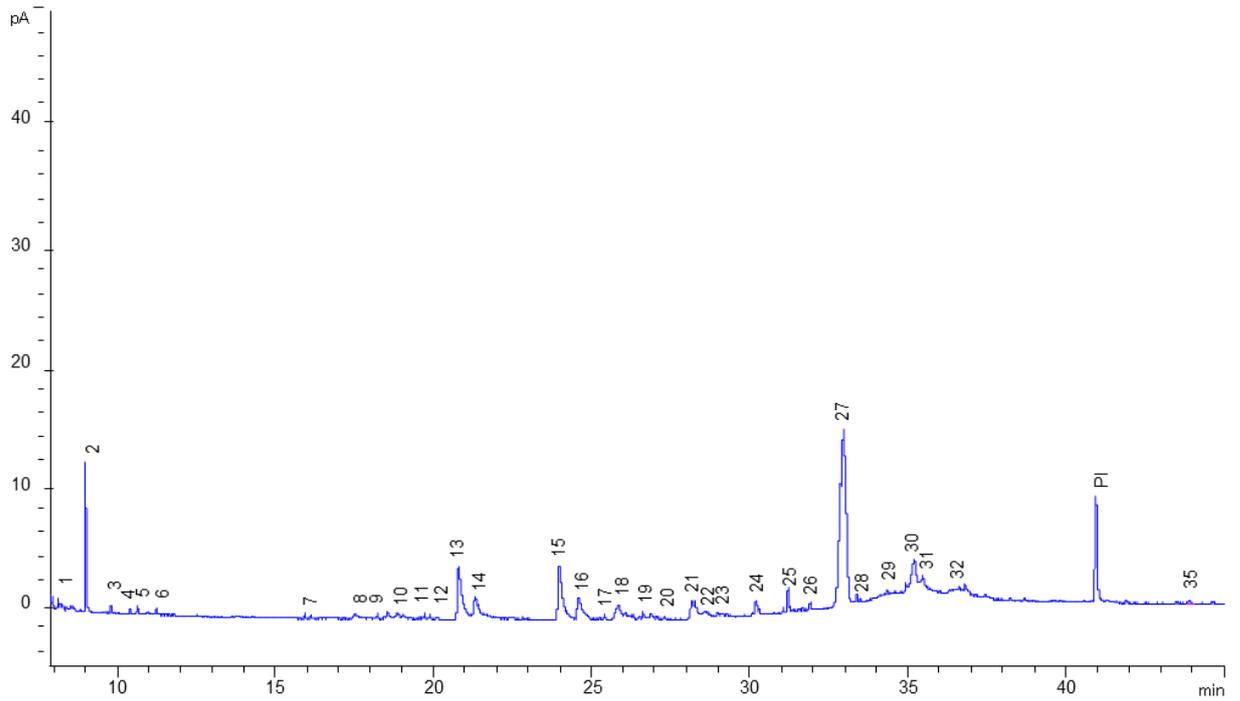
APÊNDICE A – Cromatograma dos compostos orgânicos voláteis da raça Girolando (fêmea)



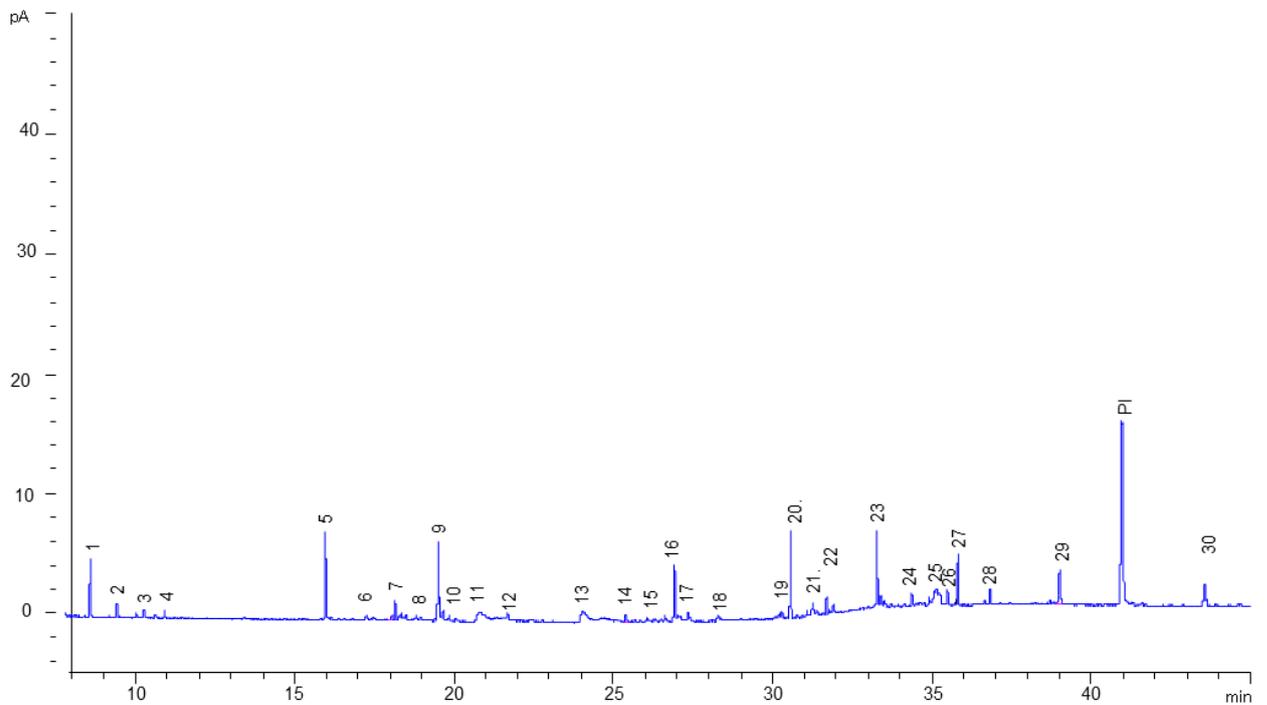
APÊNDICE B – Cromatograma dos compostos orgânicos voláteis da raça Girolando (macho)



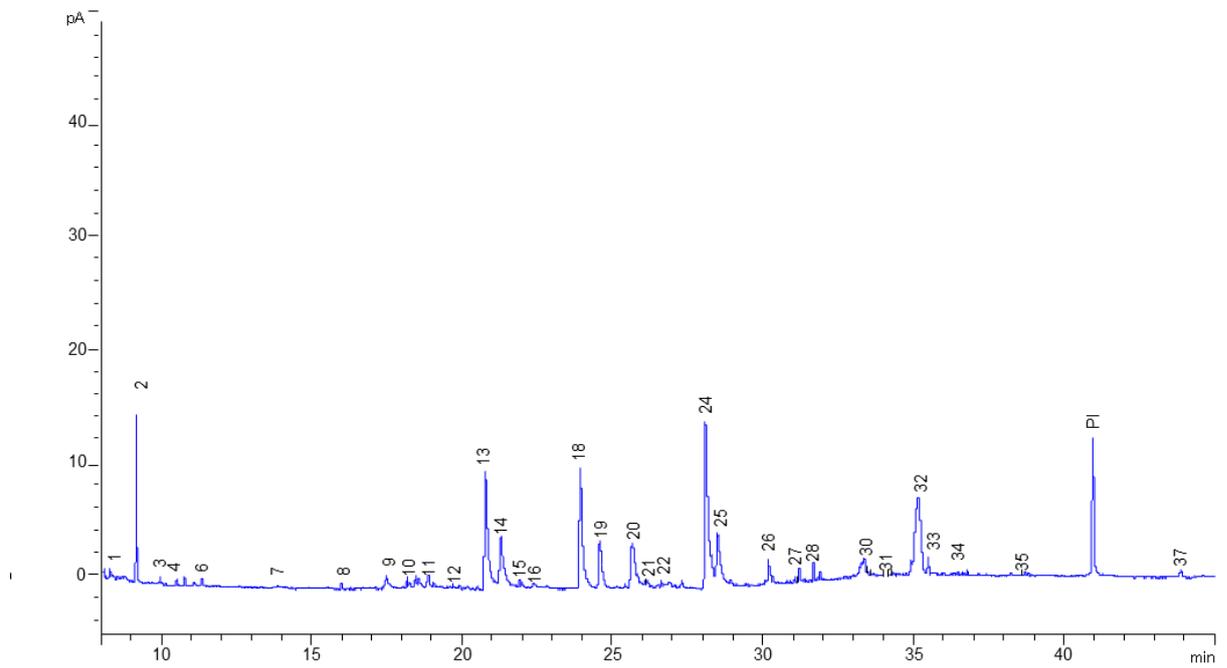
APÊNDICE C – Cromatograma dos compostos orgânicos voláteis da raça Holandesa (fêmea)



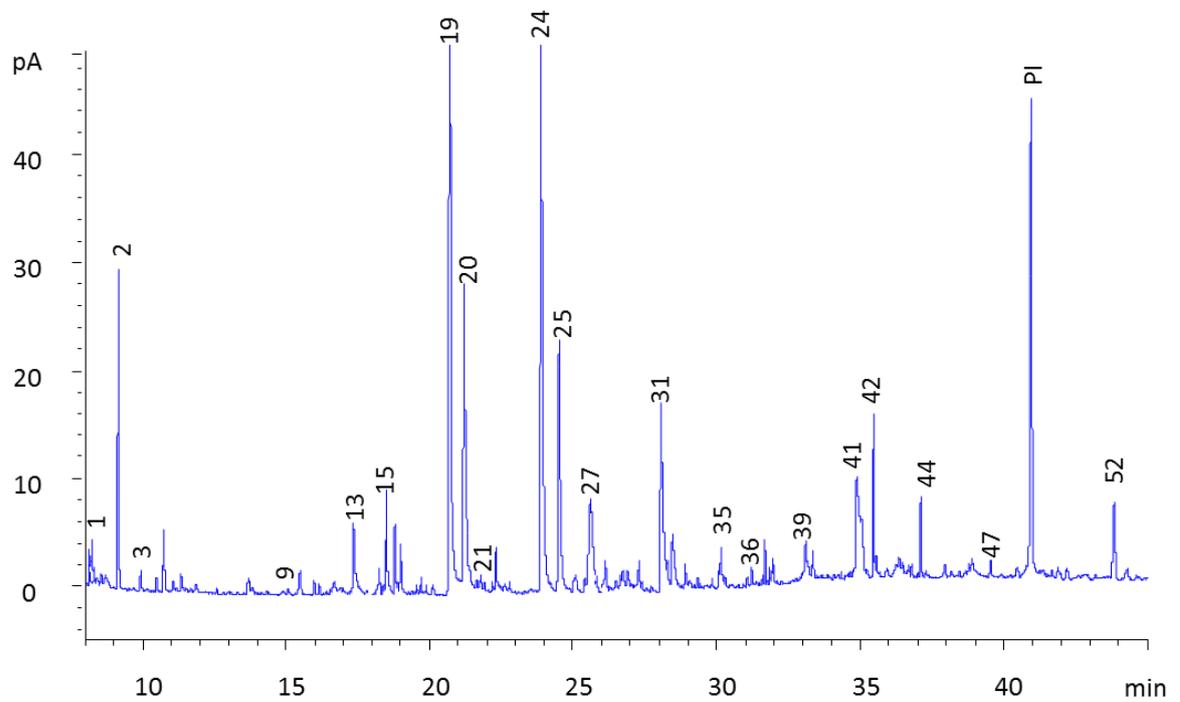
APÊNDICE D – Cromatograma dos compostos orgânicos voláteis da raça Holandesa (macho)



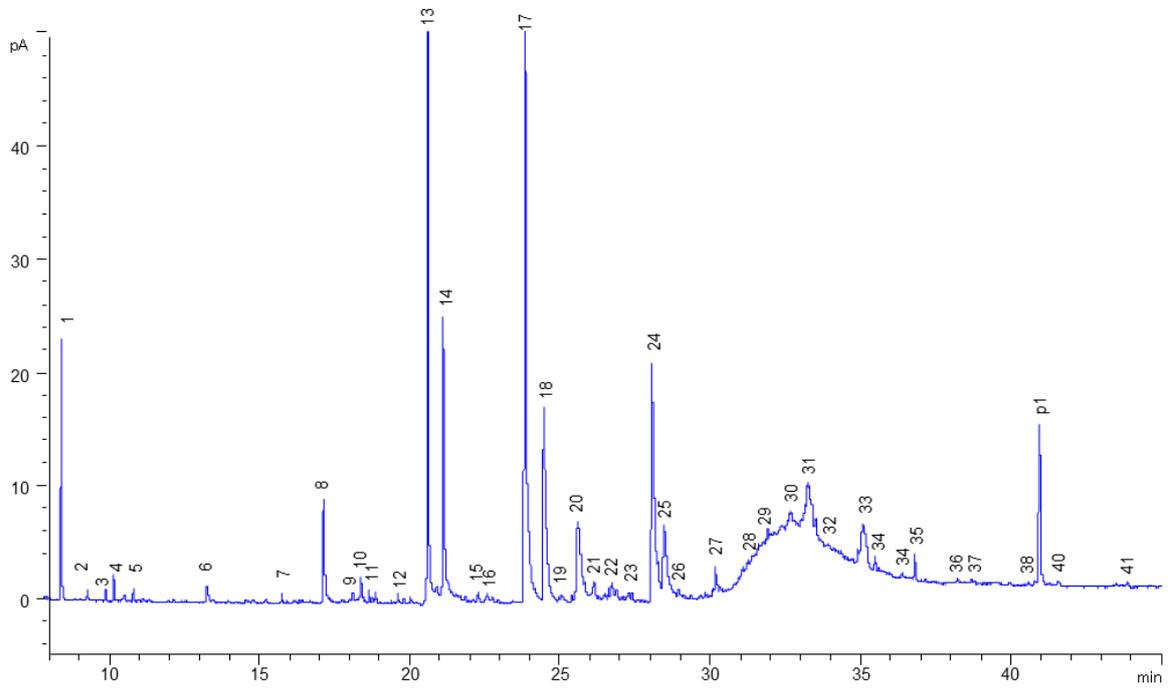
APÊNDICE E – Cromatograma dos compostos orgânicos voláteis da raça Pardo-suíça (fêmea)



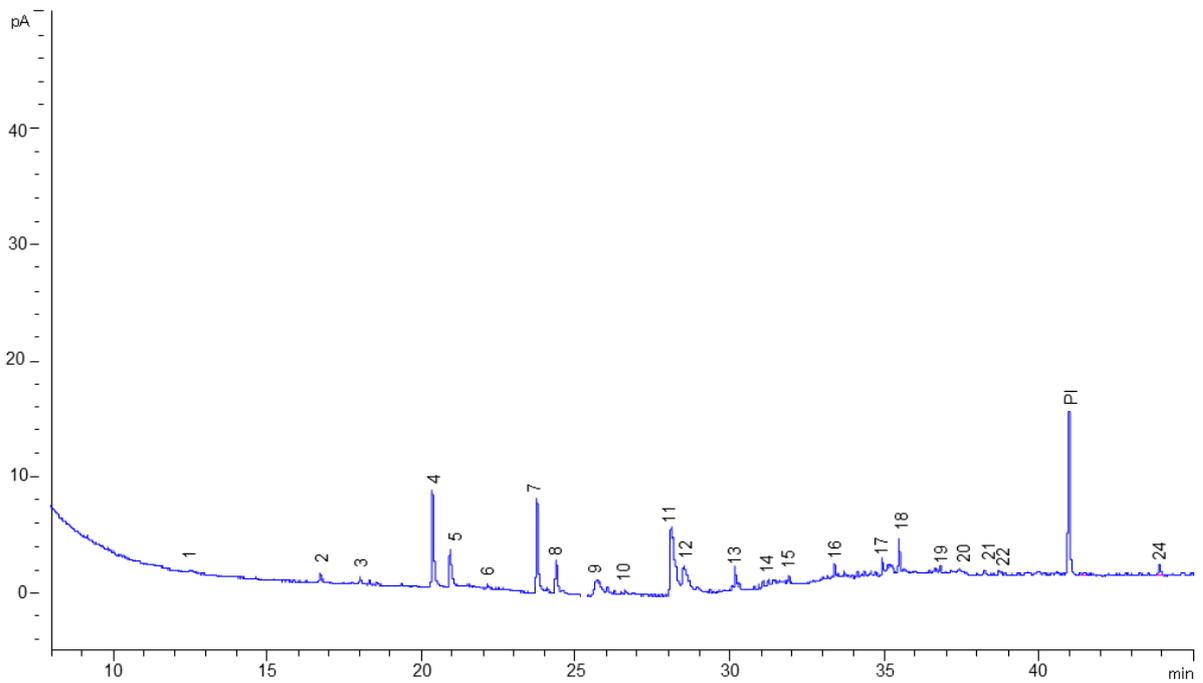
APÊNDICE F – Cromatograma dos compostos orgânicos voláteis da raça Pardo-suíça (macho)



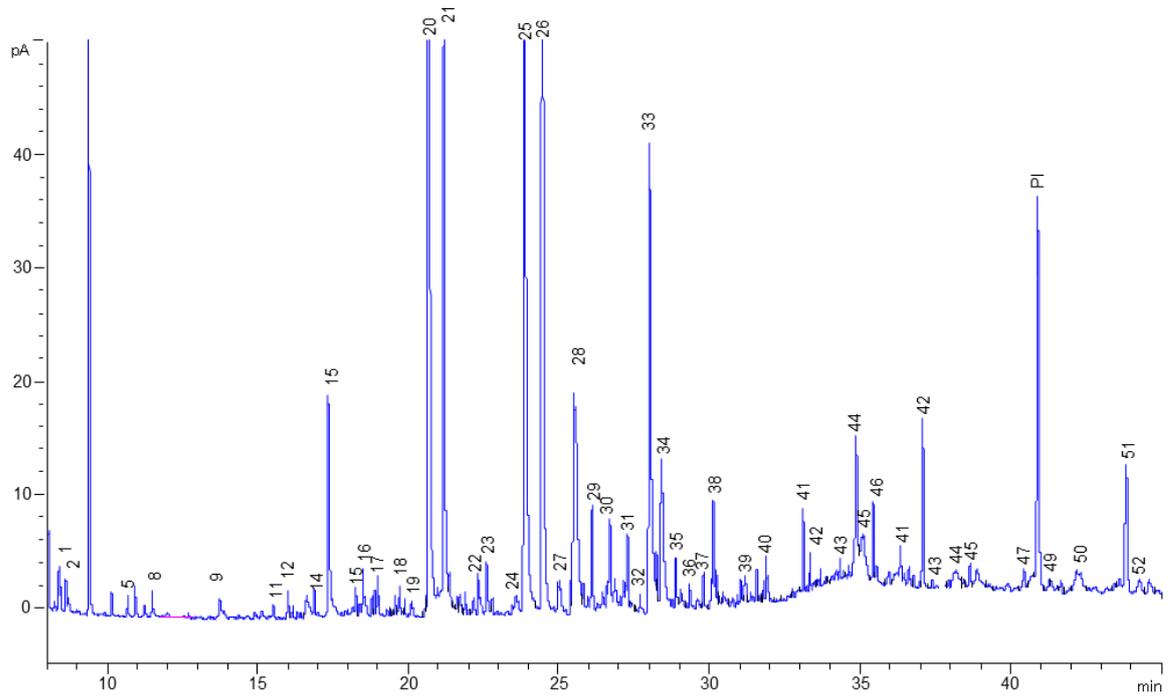
APÊNDICE G – Cromatograma dos compostos orgânicos voláteis da raça Gir (fêmea)



APÊNDICE H – Cromatograma dos compostos orgânicos voláteis da raça Gir (macho)



APÊNDICE I – Cromatograma dos compostos orgânicos voláteis da raça Nelore (fêmea)



APÊNDICE J – Cromatograma dos compostos orgânicos voláteis da raça Nelore (macho)

