

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

KECIANE MESQUITA DAS CHAGAS

**ESTUDO DO FEROMÔNIO DE *OPSIPHANES INVIRAE* (HUBNER, 1818)
(LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE)**

Maceió-AL
2018

KECIANE MESQUITA DAS CHAGAS

**ESTUDO DO FEROMÔNIO DE *OPSIPHANES INVIRAE* (HUBNER, 1818)
(LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção de grau de Doutor (a) no curso de Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima.

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana.

Maceió-AL
2018

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

Bibliotecário: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

C433e Chagas, Keciane Mesquita das.
Estudo do feromônio de *Opsiphanes invirae* (Hubner, 1818) (Lepidoptera: Nymphalidae) / Keciane Mesquita das Chagas. – 2018.
132 f. : il.

Orientador: Gaus Silvestre de Andrade Lima.
Coorientador: Antônio Euzébio Goulart Santana.
Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO, Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 112-125.
Anexos: f. 126-132.

1. Lagarta desfolhadora – Palmeira. 2. Lagarta – Comportamento sexual. 3. Feromônio. 4. Androcônia. 5. Eletroantenografia. 6. Coleta massal. (E)- β -farneseno. 7. (E)-nerolidol. 8. (Z)-7-heptadeceno. I. Título.

CDU: 577.19

KECIANE MESQUITA DAS CHAGAS

**ESTUDO DO FEROMÔNIO DE *OPSIPHANES INVIRAE* (HUBNER, 1818)
(LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE)**

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

Aprovada em: 09/07/2018.

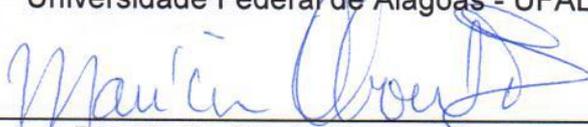
BANCA EXAMINADORA



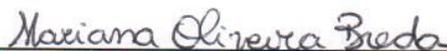
Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



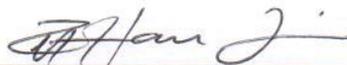
Dr. Josealdo Tonholo
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



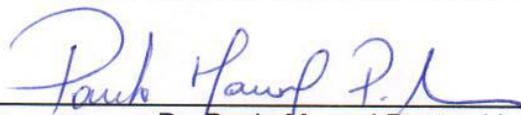
Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Dra. Mariana Oliveira Breda
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Dr. Paulo Henrique Gorgatti Zarbin
Universidade Federal do Paraná – UFPR



Dr. Paulo Manoel Pontes Lins
SOCOCO – Agroindústria da Amazônia

Dedico esta tese à minha mãe Lúcia, a maior amiga que a vida já me deu, pelo incentivo e amor incondicional, e por sempre estar ao meu lado apoiando minhas decisões, e compartilhando minhas conquistas. À ela, todo meu amor, respeito, carinho e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar ao meu lado, me guiando e orientando, e por permitir a realização de tantos sonhos nesta vida. Obrigada pela vida cheia de amor e esperança que você tem me permitido viver.

Agradeço à minha mãe, Lúcia Gomes Mesquita Mendes, por sempre me fazer sentir capaz, por seu amor incondicional, e por suas palavras de força e fé, mesmo a quilômetros de distância. Ao meu padrasto, Carlos Alberto Cardoso Mendes, pelo carinho, incentivo e presença paternal.

À minha família, por estar presente em minha vida, me apoiando e fortalecendo, sempre disposta a ajudar.

Agradeço ao meu marido, Frederico Vieira Santos, meu porto seguro, por seu amor, compreensão, caráter e inteligência, contribuindo incondicionalmente para minha realização pessoal e profissional. Sem dúvida, o meu maior incentivador e um dos grandes responsáveis por minha disciplina, força e responsabilidade durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus queridos sogros, Maria de Lourdes Vieira Silva Santos e Narro Botelho Santos, por todo apoio, carinho e orientação espiritual.

Às minhas estimadas tias, Maria do Socorro Sousa Buhatem, Maria da Graça Buhatem Medeiros e Maria de Lourdes Sousa Buhatem, por todo carinho, apoio e abrigo, e por serem peça fundamental na minha história. À minha valiosa prima, Samira Buhatem de Sousa, pela amizade incondicional.

Agradeço a todos os meus amigos, que estão sempre ao meu lado, dividindo as alegrias, compartilhando experiências, compreendendo minhas ausências e me incentivando a continuar.

Agradeço aos meus orientadores, Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima e Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana, por terem acreditado que eu seria capaz, pela orientação, compreensão e apoio durante toda a pesquisa.

Agradeço ao Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana pela inestimável orientação e exemplo de profissionalismo ao longo destes três anos e meio. Obrigada pelo apoio, mesmo antes de minha chegada à cidade de Maceió. Sou grata pela acolhida no laboratório, pelos valiosos conselhos e ensinamentos, que tanto vêm contribuindo para o meu crescimento profissional.

Agradeço ao Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima pela orientação e confiança ao longo de toda a pesquisa, com palavras de apoio e segurança desde o momento em que o conheci. Obrigada pelo profissionalismo e contribuição intelectual, oferecendo-me instrução e suporte sempre que necessitei.

Aos meus colegas do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN) pela amizade, conhecimento e agradável convívio ao longo destes anos.

Agradeço à professora Dra. Jakeline Maria dos Santos por sempre estar próxima, pelo aprendizado diário, grande apoio e conhecimento relacionados à Entomologia, somando esforços para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dra. Mariana Oliveira Breda pelo apoio e conhecimento, pelas contribuições acadêmicas, discussões, e análises estatísticas e entomológicas ao longo desta pesquisa.

Agradeço à amiga Merybeth Fernandez Triana, pela grande amizade, parceria, conhecimento, compromisso e importante contribuição às análises químicas deste trabalho, ajudando-me incondicionalmente sempre que necessitei.

À amiga Aryane Morgana por sua especial amizade e companhia nesta jornada.

À querida Dra. Isis Torres Souza, pelo carinho, compromisso e importante contribuição à etapa de síntese química realizada neste trabalho.

Agradeço ao professor Dr. Henrique Fonseca Goulart, pela experiência e todo apoio ofertado no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN).

Agradeço ao graduando Gebson Chagas Correa, por ajudar-me em uma importante etapa do meu trabalho, oferecendo-me apoio e companhia.

Ao pesquisador Dr. João Gomes, pela atenção e contribuição nas análises estatísticas desta pesquisa.

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Tinôco, por todo o auxílio e conhecimento oferecido durante os estudos em campo e laboratório na empresa Agropalma.

A todos os funcionários da empresa Agropalma, que contribuíram de alguma forma ao desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Gilson Sanchez Chia, pelas incontáveis noites perdidas para realização de meu transporte até a fazenda Agropalma, e desta ao aeroporto, auxiliando-me no que fosse necessário durante a coleta e pesquisa em campo.

Meu sincero agradecimento ao Sr. Elielson Lôbo, por seu profissionalismo e grande auxílio durante minhas experiências de coleta e avaliações em campo na fazenda Agropalma, colaborando comprometidamente do início ao fim, para a concretização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Lins pelo auxílio na fazenda Sococo durante toda a pesquisa. Aos funcionários desta empresa que me apoiaram dia a dia durante três meses.

Agradeço a todos os professores e funcionários do IQB/UFAL que se fizeram presentes, contribuindo direta e indiretamente para minha formação.

Ao Instituto Federal do Maranhão/IFMA, Campus Caxias. À Universidade Federal de Alagoas/UFAL. Às empresas parceiras deste projeto Agropalma e Sococo S/A, por todo suporte apoio. À CAPES pela concessão de bolsa.

Ofereço ao meu marido Frederico, pelo incentivo, companheirismo, apoio intelectual, e sobretudo emocional, essenciais nesta jornada. A ele, todo meu amor e gratidão por estar ao meu lado, e fazer parte desta conquista. Ao nosso filho Gabriel Mesquita Santos, pois lá no fundo tudo sempre foi feito pensando em sua chegada.

RESUMO

A praga *Opsiphanes invirae* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Nymphalidae), conhecida como lagarta-desfolhadora-das-palmeiras ataca importantes plantas da família Arecácea de interesse socioeconômico. Na fase de lagarta provoca a desfolha das plantas, causando sérios danos aos cultivos agrícolas. No estado do Pará, seus prejuízos são mais evidentes nas culturas do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) e palma de óleo (*Elais guineenses* Jacq.), estando entre as lagartas desfolhadoras mais importantes e frequentes em plantios no norte do Brasil. Visando a busca por métodos de controle sustentáveis para as culturas de arecáceas, este trabalho teve como objetivo identificar o dimorfismo sexual, descrever o comportamento sexual da espécie, caracterizar os tipos de sensilas presentes nas antenas, investigar a presença de feromônio sexual em ambos os sexos, bem como, avaliar a atratividade em campo das misturas do feromônio de agregação proposto. O dimorfismo sexual, relacionado à presença de feromônio foi caracterizado pela identificação das androcônias, presentes nos machos. Os estudos do comportamento dos insetos ocorreram em condições de campo e semi-campo nas fazendas Sococo e Agropalma, ambas no estado do Pará, e na Universidade Federal de Alagoas (UFAL). A atividade sexual de *O. invirae* foi caracterizada pelos comportamentos de corte de ambos os sexos, pré-cópula com a disseminação do feromônio afrodisíaco dos machos para estímulo sexual das fêmeas, e cópula. O estudo da distribuição e tipos de sensilas antenais associadas ao comportamento foram realizados nas antenas de machos e fêmeas de *O. invirae*. A análise morfológica das antenas, permitiu identificar seis tipos de sensilas: duas tricoides, três caéticas, coleocônicas, esquamiformes, aurículas e a de Bohm. As sensilas tricoides foram as mais abundantes na antena, sendo estas reconhecidas por sua função de receptoras de feromônio. Os voláteis de *O. invirae* foram obtidos através das técnicas de aeração dinâmica e extração por solvente de partes do corpo do inseto. As análises químicas revelaram a presença de compostos macho-específicos, tais como: linalol, (*E*)- β -Farneseno, (*E*)-nerolidol, (*Z*)-7-hexadeceno e (*Z*)-7-heptadeceno. Além destes, a presença do composto (*E*)- β -ocimeno, comum à machos e fêmeas. As antenas das fêmeas apresentaram uma resposta significativa aos extratos dos machos nos ensaios eletroantegráficos, indicando a presença de compostos biologicamente ativos no macho. As análises eletrofisiológicas, revelaram que nas amostras da asa posterior do macho, três compostos provocaram a despolarização nas antenas das fêmeas, sendo estes, (*E*)- β -farneseno, (*E*)-nerolidol e (*Z*)-7-heptadeceno. O proposto feromônio de agregação de *O. invirae*, constituído pelos compostos (*E*)- β -farneseno, (*E*)-nerolidol e (*Z*)-7-heptadeceno, demonstrou ser efetivo para a captura dos insetos-pragas nas armadilhas, contribuindo para o manejo desta praga.

Palavras-chave: Lagarta-desfolhadora-das-palmeiras. Feromônio de agregação. Comportamento sexual. Androcônia. Eletroantegráfia. Coleta massal. (*E*)- β -farneseno. (*E*)-nerolidol. (*Z*)-7-heptadeceno.

ABSTRACT

The species *Opsiphanes invirae* 1818 (Lepidoptera: Nymphalidae), known as the palm tree defoliator caterpillar, is a plague that attacks important plants of the Arecaceae family of socioeconomic interest. During the larval stage this plague causes defoliation of plants, causing severe damage to agricultural crops. In the State of Pará its damages are more evident in coconut (*Cocos nucifera* L.) and palm oil crops (*Elais guineenses* Jacq.), being among the most important and frequent defoliator larvae in plantations in northern Brazil. Aiming the search for sustainable control methods for Arecaceae crops, this study aimed to identify the sexual dimorphism, describe the species sexual behavior, characterize the types of antennal sensilla, identify the occurrence of sex pheromone in both sexes, as well as evaluate the attractiveness in field using the proposed aggregation pheromone mixtures. Sexual dimorphism, related to the presence of pheromone, was characterized by the identification of androconia which occur in male. Studies of insect behavior took place in field and semi-field conditions at Sococo and Agropalma farms, both in the state of Pará, and at the Federal University of Alagoas (UFAL). The sexual activity of *O. invirae* was characterized by the cutting behaviors of both sexes, pre-copulation with the dissemination of the male aphrodisiac pheromone for the sexual stimulation of females, and copulation. The study of distribution and types of antennal sensilla associated to behavior were performed in both male and female antenna of *O. invirae*. Through morphological analysis of the antenna it was possible to identify six types of sensilla: two types of trichodea sensilla, three types of chaetica, coeloconica, squamiformia, aurilica and Bohm sensilla. Trichodea sensilla were the most abundant in the antenna known for its pheromone receptor role. The volatiles of *O. invirae* were obtained through the dynamic aeration and solvent extraction techniques of insect body parts. Chemical analysis revealed the presence of male-specific compounds such as: linalool, (*E*)- β -Farnesene, (*E*)-nerolidol, (*Z*)-7-hexadecene and (*Z*)-7-heptadecene as well as (*E*)- β -ocimene, common to both male and female. The female antennae revealed a significant response to the extracts of male in the electroantennographic assays thus indicating the presence of biologically active compounds in the male. Electrophysiological analyzes revealed that in the samples of male's posterior wing, three compounds caused depolarization in the antennae of *O. invirae* females: (*E*)- β -Farnesene, (*E*)-nerolidol and (*Z*)-7-heptadecene. The proposed *O. invirae* aggregation pheromone, consisting of the compounds (*E*)- β -farnesene, (*E*)-nerolidol and (*Z*)-7-heptadecene, was effective on the capture of insect pests in traps, contributing to their management.

Keywords: Palm tree defoliator caterpillar. Aggregation pheromone. Sexual behavior. Androconia. Electroantennography. Mass collection. (*E*)- β -farnesene. (*E*)-nerolidol. (*Z*)-7-heptadecene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Adultos de <i>Opsiphanes invirae</i> (Lepidoptera: Nymphalidae): Fêmea (A) e macho (B).....	21
Figura 2	- Lagarta e crisálida de <i>Opsiphanes invirae</i> (Lepidoptera: Nymphalidae): (A) lagarta no último ínstar; (B) crisálida sadia (esquerda) e parasitada (direita)	22
Figura 3	- Ciclo de vida de <i>Opsiphanes invirae</i> (Lepidoptera: Nymphalidae).....	23
Figura 4	- Dano provocado pela lagarta de <i>Opsiphanes invirae</i> (Lepidoptera: Nymphalidae) em plantas de palma de óleo (<i>Elaeis guineenses</i>).....	25
Figura 5	- Armadilhas utilizadas em campo para captura de <i>O. invirae</i>	27
Figura 6	- A) Adultos de <i>Opsiphanes invirae</i> alimentando-se com solução de melação a 15%; B) telado utilizado na condição de semi-campo para avaliação do comportamento sexual	42
Figura 7	- A) Equipamento utilizado para metalização das antenas de <i>Opsiphanes invirae</i> ; B) antenas metalizadas	43
Figura 8	- Dimorfismo sexual em crisálidas de <i>Opsiphanes invirae</i>	44
Figura 9	- Dimorfismo sexual em crisálidas de <i>Opsiphanes invirae</i>	45
Figura 10	- Dimorfismo sexual em adultos de <i>Opsiphanes invirae</i>	46
Figura 11	- Dimorfismo nas asas posteriores do adulto macho de <i>Opsiphanes invirae</i>	47
Figura 12	- A) Abdome do macho de <i>Opsiphanes invirae</i> ; B) placas glandulares no quarto e quinto segmento abdominal; C) detalhe do tamanho das placas: com aproximadamente 4 mm de comprimento e 1 mm de largura	48
Figura 13	- A) Asa posterior do macho de <i>Opsiphanes invirae</i> , com presença de regiões odoríferas; B) detalhe da região odorífera brilhante na asa (cinza-marrom), associada a pincel pelo; C) detalhe da região com líquido odorífero abaixo das escamas, e entre os pincéis de pelos; D) imagem da dilatação com líquido odorífero (cor laranja), após retirada das escamas e pincéis de pelos para melhor visualização. (* escamas; (seta) pincel de pelos	49

Figura 14 - Corte da fêmea e do macho de <i>Opsiphanes invirae</i>	51
Figura 15 - Corte do macho de <i>Opsiphanes invirae</i> : A) macho toca asa da fêmea com as antenas; B) macho se posiciona ao lado da fêmea, expõe abdome para iniciar tentativa de tocar a genitália da fêmea	51
Figura 16 – Etograma da sequência comportamental de pré-cópula e cópula de <i>O. invirae</i>	53
Figura 17 – A e B) Acoplamento das genitálias de macho e fêmea de <i>Opsiphanes invirae</i> durante a cópula	54
Figura 18 – Fluxograma do comportamento reprodutivo de <i>Opsiphanes invirae</i> ...	55
Figura 19 - Cópulas de <i>Opsiphanes invirae</i>	56
Figura 20 - A e B) Fêmea de <i>Opsiphanes invirae</i> ovipositando; B) Ovos no pecíolo de folha de coqueiro	57
Figura 21 - Regiões da antena de <i>Opsiphanes invirae</i>	60
Figura 22 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das antenas de machos de <i>Opsiphanes invirae</i> : vista dorsal da antena caracterizada por três cristas longitudinais separando dois sulcos	61
Figura 23 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das antenas fêmeas (A, B e C) de <i>Opsiphanes invirae</i> . Tr1 e Tr2 = sensilas tricoides; P = presença de orifícios	62
Figura 24 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das antenas de fêmeas de <i>Opsiphanes invirae</i> . Co-sensilas coleocônicas; Tr1 e Tr2 - sensilas tricoides	63
Figura 25 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das antenas de machos (A) e fêmeas (B, C e D) de <i>Opsiphanes invirae</i> . Ca1, Ca2 e Ca3 - sensilas caéticas	64
Figura 26 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das antenas de fêmeas de <i>Opsiphanes invirae</i> . Sq - sensilas esquamiforme; Sc-escamas	65
Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das antenas de fêmeas de <i>Opsiphanes invirae</i> . Au - sensilas auricílicas; Sq - sensilas esquamiforme	65
Figura 28 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das antenas	

	de machos de <i>Opsiphanes invirae</i> . Bh - sensilas de Böhm	66
Figura 29 -	Métodos de coleta de <i>Opsiphanes invirae</i> em plantio de palma de óleo	72
Figura 30 -	A) Crisálida macho de <i>Opsiphanes invirae</i> próximo a emergência (seta indicando a mancha característica presente apenas nos indivíduos machos); B) detalhe do fio de seda usado para pupação	73
Figura 31 -	Sistema de aeração utilizado para coleta de voláteis de machos e fêmeas de <i>Opsiphanes invirae</i>	74
Figura 32 -	A) Regiões utilizadas para preparação dos extratos de <i>Opsiphanes invirae</i> ; B) béqueres contendo diferentes estruturas do inseto para extração cuticular por solvente de machos e fêmeas virgens: 1= asas anteriores; 2=asas posteriores; 3= abdome; 4, 5 e 6= pernas anteriores, medianas e posteriores; 7= genitália	75
Figura 33 -	Antena de <i>Opsiphanes invirae</i>	77
Figura 34 -	Preparação das armadilhas para teste de atratividade com as misturas do feromônio de <i>Opsiphanes invirae</i>	79
Figura 35 -	Cromatogramas dos voláteis de aeração de machos e fêmeas virgens de <i>Opsiphanes invirae</i> , com idade entre 24 a 72 h, evidenciando a presença de compostos macho-específico	81
Figura 36 -	Estrutura dos compostos identificados nos voláteis de aeração de <i>Opsiphanes invirae</i>	82
Figura 37 -	Espectro de massas do composto 1: (<i>E</i>)- β -ocimeno dos voláteis de aeração de <i>Opsiphanes invirae</i>	82
Figura 38 -	Cromatograma resultante da coinjeção em coluna RTX-1 do composto produzido por machos e fêmeas de <i>Opsiphanes invirae</i> e do (<i>E</i>)- β -ocimeno	83
Figura 39 -	Espectro de massas do composto 2: Linalol nos voláteis de aeração do macho de <i>Opsiphanes invirae</i>	83
Figura 40 -	Cromatograma resultante da coinjeção em coluna RTX-1 do composto produzido pelos machos <i>Opsiphanes invirae</i> e do linalol	84

Figura 41 -	Espectro de massas do composto 3: (<i>E</i>)- β -Farneseno nos voláteis de aeração do macho de <i>Opsiphanes invirae</i>	84
Figura 42 -	Cromatograma resultante da coinjeção em coluna RTX-1 do composto produzido pelos machos <i>Opsiphanes invirae</i> e do (<i>E</i>)- β -Farneseno	85
Figura 43 -	Espectro de massas do composto 4: (<i>E</i>)-Nerolidol nos voláteis de aeração do macho de <i>Opsiphanes invirae</i>	85
Figura 44 -	Cromatograma resultante da coinjeção em coluna RTX-1 do composto produzido pelos machos <i>Opsiphanes invirae</i> e do (<i>E</i>)-Nerolidol	86
Figura 45 -	Espectro de massas do composto 5: (<i>Z</i>)-7-Hexadeceno nos voláteis de aeração do macho de <i>Opsiphanes invirae</i>	87
Figura 46 -	Espectro de massas do composto derivatizado 5: (<i>Z</i>)-7-hexadeceno nos voláteis de aeração do macho de <i>Opsiphanes invirae</i>	87
Figura 47 -	Cromatograma resultante da coinjeção em coluna RTX-1 do composto produzido pelos machos <i>Opsiphanes invirae</i> e do (<i>Z</i>)-7-Hexadeceno	88
Figura 48 -	Espectro de massas do composto 6: (<i>Z</i>)-7-Heptadeceno nos voláteis de aeração do macho de <i>Opsiphanes invirae</i>	88
Figura 49 -	Espectro de massas do composto derivatizado 6: (<i>Z</i>)-7-Heptadeceno nos voláteis de aeração do macho de <i>Opsiphanes invirae</i>	89
Figura 50 -	Cromatograma resultante da coinjeção em coluna RTX-1 do composto produzido pelos machos <i>Opsiphanes invirae</i> e do (<i>Z</i>)-7-heptadeceno	89
Figura 51 –	Cromatogramas das amostras dos extratos hexânicos de partes de <i>Opsiphanes invirae</i> confirmando a presença de compostos macho-específico. Compostos presentes na asa posterior, abdome e androcônias (bolsa odorífera e região cinza-marrom): 1- (<i>E</i>)- β -Farneseno; 2- (<i>E</i>)-nerolidol; 3- (<i>Z</i>)-7-hexadeceno; 4- (<i>Z</i>)-7-heptadeceno	90
Figura 52 –	Cromatogramas dos voláteis de aeração e extrato hexânico da asa posterior dos machos virgens de <i>Opsiphanes invirae</i>	

	com idade entre 24 a 72 h. Compostos macho-específico: 1- (<i>E</i>)- β -Farneseno; 2- (<i>E</i>)-nerolidol; 3- (<i>Z</i>)-7-hexadeceno; 4- (<i>Z</i>)-7-heptadeceno	90
Figura 53 -	Média e desvio padrão das respostas eletroantenográficas das antenas dos machos de <i>Opsiphanes invirae</i> aos extratos do macho (asa posterior e abdome) e hexano (controle)	92
Figura 54 -	Média e desvio padrão das respostas eletroantenográficas das antenas dos machos de <i>Opsiphanes invirae</i> aos voláteis das fêmeas e hexano (controle)	92
Figura 55 -	Média e desvio padrão das respostas eletroantenográficas das antenas das fêmeas de <i>Opsiphanes invirae</i> aos extratos do macho (asa posterior e abdome) e hexano (controle)	93
Figura 56 -	Média e desvio padrão das respostas eletroantenográficas das antenas das fêmeas de <i>Opsiphanes invirae</i> aos voláteis das fêmeas e hexano (controle)	93
Figura 57 -	Média e desvio padrão das respostas eletroantenográficas das antenas das fêmeas de <i>Opsiphanes invirae</i> aos voláteis de aeração dos machos e controle (hexano)	94
Figura 58 -	Cromatograma (GC-FID) do extrato da asa posterior do macho de <i>Opsiphanes invirae</i> e a resposta eletroantenográfica (GC-EAD) da antena da fêmea coespecífica. As setas indicam os compostos para os quais houve despolarização da antena	95
Figura 59 –	Número de espécimes adultos de <i>Opsiphanes invirae</i> capturados nas armadilhas iscadas com mistura de feromônios em campo, versus controle	97
Figura 60 -	Número de insetos adultos de <i>Opsiphanes invirae</i> capturados durante o monitoramento nas armadilhas iscadas com misturas de feromônio em campo, versus controle	98
Figura 61 -	Número de insetos adultos machos e fêmeas de <i>Opsiphanes invirae</i> capturados nas armadilhas iscadas com misturas de feromônio em campo, versus controle, no primeiro monitoramento. T1- (<i>E</i>)- β -Farneseno, (<i>E</i>)-nerolidol e (<i>Z</i>)-7-heptadeceno); T2- (<i>E</i>)- β -ocimeno, (<i>E</i>)- β -Farneseno, (<i>E</i>)-nerolidol, e (<i>Z</i>)-7-heptadeceno; T3- (<i>E</i>)- β -Farneseno e	

	(<i>E</i>)-nerolidol	99
Figura 62 -	Número de insetos adultos machos e fêmeas de <i>Opsiphanes invirae</i> capturados nas armadilhas iscadas com misturas de feromônio em campo, versus controle, no segundo monitoramento. T1- (<i>E</i>)- β -Farneseno, (<i>E</i>)-nerolidol e (<i>Z</i>)-7-heptadeceno); T2- (<i>E</i>)- β -ocimeno, (<i>E</i>)- β -Farneseno, (<i>E</i>)-nerolidol, e (<i>Z</i>)-7-heptadeceno; T3- (<i>E</i>)- β -Farneseno e (<i>E</i>)-nerolidol	100
Figura 63 -	Número de insetos adultos machos e fêmeas de <i>Opsiphanes invirae</i> capturados nas armadilhas iscadas com misturas de feromônio em campo, versus controle, no terceiro monitoramento. T1- (<i>E</i>)- β -Farneseno, (<i>E</i>)-nerolidol e (<i>Z</i>)-7-heptadeceno); T2- (<i>E</i>)- β -ocimeno, (<i>E</i>)- β -Farneseno, (<i>E</i>)-nerolidol, e (<i>Z</i>)-7-heptadeceno; T3- (<i>E</i>)- β -Farneseno e (<i>E</i>)-nerolidol.....	101
Figura 64 -	Número de insetos adultos machos e fêmeas de <i>Opsiphanes invirae</i> capturados nas armadilhas iscadas com mistura de feromônio em campo, versus controle, no quarto monitoramento. T1- (<i>E</i>)- β -Farneseno, (<i>E</i>)-nerolidol e (<i>Z</i>)-7-heptadeceno); T2- (<i>E</i>)- β -ocimeno, (<i>E</i>)- β -Farneseno, (<i>E</i>)-nerolidol, e (<i>Z</i>)-7-heptadeceno; T3- (<i>E</i>)- β -Farneseno e (<i>E</i>)-nerolidol.....	102
Figura 65 -	Número de insetos adultos machos e fêmeas de <i>Opsiphanes invirae</i> capturados nas armadilhas iscadas com misturas de feromônio em campo, versus controle, no quinto monitoramento.....	103
Figura 66 -	Número de espécimes adultos de <i>O. invirae</i> capturados nas armadilhas iscadas com mistura de feromônios em campo, versus controle	104
Figura 67 –	Insetos predadores de adultos e lagartas de <i>O. invirae</i>	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Espécies de insetos machos que emitem aromas perceptíveis aos humanos e qualificados de acordo com o tipo de odor (BARTH, 1980).....	34
Tabela 2 -	Composição química correspondente aos picos presentes nas amostras de aeração de machos e fêmeas de <i>Opsiphanes invirae</i>	81
Tabela 3 -	Índice de Kovats correspondente aos compostos no extrato da asa posterior dos machos de <i>Opsiphanes invirae</i>	91

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	<i>Opsiphanes Invirae</i>.....	20
2.1.1	Distribuição biogeográfica e plantas hospedeiras de <i>O. invirae</i>	20
2.1.2	Aspectos biológicos e comportamentais.....	21
2.1.3	Danos e importância econômica	24
2.2	Monitoramento de <i>O. invirae</i>	25
2.3	Controle de <i>O. Invirae</i>	26
2.3.1	Controle Massal de <i>O. invirae</i>	26
2.3.2	Controle Biológico de <i>O. Invirae</i>	27
2.4	Controle mediado por semioquímicos	28
2.4.1	Uso de Feromônios Sexuais no MIP	29
2.4.2	Feromônios sexuais de Lepidópteros	32
2.4.3	Feromônios sexuais de macho em lepidóptera	32
3	COMPORTAMENTO SEXUAL E MORFOLOGIA DA ANTENA DE <i>OPSIPHANES INVIRAE</i>.....	37
3.1	Introdução	38
3.2	Materiais e Métodos	39
3.2.1	Coleta e manutenção dos insetos.....	40
3.2.2	Dimorfismo sexual em <i>Opsiphanes invirae</i>	40
3.2.3	Análise do comportamento sexual de <i>O. invirae</i>	41
3.2.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de antenas de <i>O. invirae</i>	42
3.3	Resultados e Discussão	43
3.3.1	Dimorfismo sexual em <i>Opsiphanes invirae</i>	43
3.3.2	Análise do comportamento sexual de <i>Opsiphanes invirae</i>	50
3.3.2.1	Corte.....	50
3.3.2.2	Pré-cópula e cópula.....	52
3.3.2.3	Pós-cópula.....	54
3.3.3	Morfologia das antenas de <i>Opsiphanes invirae</i>	59
3.4	Conclusão	67
4	FEROMÔNIO DE <i>OPSIPHANES INVIRAE</i> HUBNER, 1808 (<i>LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE</i>)	68

4.1	Introdução	69
4.2	Materiais e Métodos	70
4.2.1	Coleta dos insetos	70
4.2.2	Extração e isolamento do feromônio de <i>Opsiphanes invirae</i>	73
4.2.2.1	Processo de aeração.....	73
4.2.2.2	Extração cuticular por solvente das partes do corpo de machos e fêmeas de <i>Opsiphanes invirae</i>	74
4.2.3	Identificação do feromônio de <i>Opsiphanes invirae</i>	76
4.2.3.1	Análise dos extratos obtidos de <i>Opsiphanes invirae</i> por Cromatografia Gasosa (GC-FID) e (GC-MS)	76
4.2.3.2	Identificação dos compostos bioativos para o inseto por Eletroantenografia (GC-EAG).....	77
4.2.3.3	Avaliação da atividade biológica do feromônio na captura de <i>Opsiphanes invirae</i> em condições de campo	78
4.3	Resultados e Discussão	80
4.3.1	Identificação do feromônio de <i>Opsiphanes invirae</i>	80
4.3.1.1	Aeração	80
4.3.1.2	Extração cuticular por solvente de partes do corpo de <i>Opsiphanes invirae</i>	89
4.3.2	Bioensaios eletroantenográficos.....	91
4.3.3	Avaliação da atividade biológica dos compostos de <i>Opsiphanes invirae</i> em condições de campo.....	95
5	CONCLUSÕES	111
	REFERÊNCIAS	112
	ANEXO	126

1 INTRODUÇÃO GERAL

Opsiphanes invirae (Hubner, 1818) (Lepidoptera: Nymphalidae) é uma espécie com ocorrência relatada desde a década de 40 e está distribuída na América Central e do Sul (LEPESME, 1947; BRISTOLW, 1991). No Brasil, sua ocorrência foi relatada em quase todos os estados, a partir da década de 60 (SILVA et al., 1968; FERREIRA et al. 1998). Inicialmente, os surtos ocorriam esporadicamente e de maneira isolada, assim, *O. invirae* mantinha o status de praga secundária. A partir da década de 70, esta espécie passou a ser relatada como importante praga do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) e da palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) (LORDELLO, 1949; RAI, 1973). Nas últimas décadas, no estado do Pará, *O. invirae* vem causando prejuízos evidentes em ambas as culturas, passando a ser considerada praga primária, estando entre as lagartas desfolhadoras mais importantes e frequentes em plantios no norte do Brasil (HOMMA et al., 2005; RIBEIRO et al., 2010; FERREIRA et al., 2015; TINÔCO, 2016).

De maneira geral, *O. invirae* infesta arecáceas de relevante interesse socioeconômico, causando a destruição dos folíolos, levando a grandes prejuízos econômicos (BRANDÃO et al., 2017; FERREIRA et al., 2015; TINÔCO, 2016). As lagartas alimentam-se de folhas, destruindo o limbo foliar, provocando sérios danos em suas plantas hospedeiras (NETO DE SÁ et al., 2011). O desfolhamento causado por seu hábito alimentar, afeta a transpiração e fotossíntese da planta, atrasando seu desenvolvimento e a produtividade (FERREIRA; LINS, 2006; FERREIRA et al., 2015).

O manejo de *O. invirae* é realizado com uso de armadilhas atraentes contendo solução de melaço e às vezes inseticida, além de pulverizações com *Bacillus thuringiensis* (Bt), uma bactéria entomopatogênica bastante utilizada por sua capacidade de produzir cristais tóxicos aos insetos durante o seu processo de esporulação (BRANDÃO et al., 2017; FERREIRA et al., 2015). Embora na literatura se encontre relato do uso do inseticida químico triclorphon a 0,1 % em armadilhas distribuídas no campo para controle dos adultos de *O. invirae* (HOMA et al., 2005), no site do AGROFIT (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários) verifica-se a recomendação de apenas o inseticida biológico Dipel (Bt) para as culturas do coqueiro e bananeira. Apesar da aplicação de *B. thuringiensis* reunir vantagens, como especificidade e seletividade, sua baixa persistência em campo, tornou-se um

dos principais entraves para seu uso em larga escala (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; POLANCZYK et al., 2006).

Dessa forma, a necessidade de implementação do Manejo Integrado de Pragas (MIP), associando as estratégias utilizadas com a adoção de novas técnicas, de baixo ou nenhum impacto ambiental torna-se de grande importância para o controle efetivo para o controle de *O. invirae* (VILELA, 1992). Com isso, o uso de feromônios tem sido considerado a base para estratégias eficientes e sustentáveis de manejo de insetos pragas (WITZGALL et al., 2010).

Apesar dos feromônios apresentarem vantagens relevantes em relação aos inseticidas sintéticos, tais como especificidade, segurança para organismos benéficos e ausência de toxicidade (BENTO et al., 2016), na literatura ainda não há dados sobre a utilização de semioquímicos no manejo de *O. invirae*. No entanto, sabe-se que os feromônios sexuais, podem ser úteis em armadilhas como instrumento de detecção e controle de insetos-pragas (EL-SAYED et al., 2006; KNIGHT et al, 2014; TREMATERRA, 1997).

Diversas abordagens empregam feromônios para manipular ou interromper o comportamento natural dos insetos, de forma que haja redução no nível populacional e redução dos danos aos cultivos (WELTER et al., 2005). Até o momento, não foram relatados estudos sobre o comportamento reprodutivo e a composição química do feromônio de *O. invirae*. Dessa forma, conhecer o comportamento do inseto é fundamental para uma abordagem mais intensiva no controle da praga, assim como para o desenvolvimento de estratégias de manejo.

O presente trabalho objetivou o estudo da ecologia química de *O. invirae* visando desenvolvimento e aplicação do feromônio sintético para o controle e monitoramento dessa praga. Deste modo, tais conhecimentos poderão contribuir significativamente para a adoção de novas técnicas de manejo integrado nas culturas agrícolas.

2 REVISÃO DE LITERATURA.

2.1 *Opsiphanes Invirae*

2.1.1 Distribuição biogeográfica e plantas hospedeiras de *O. invirae*

O gênero *Opsiphanes* Doubleday (1849) (Lepidoptera: Nymphalidae), está distribuído nas regiões da América Central e do Sul, e compreende 13 espécies descritas (DA NEVES, 2016; PENZ, 2007). A espécie neotropical *Opsiphanes invirae* (Huebner, 1818) (AUSTIN et al., 2007; DA NEVES, 2016; CASAGRANDE, 1995), é considerada uma importante praga de culturas agrícolas da família Arecaceae (FERREIRA et al., 2015). Sua disseminação no Brasil tem sido registrada em diferentes biomas: Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica, demonstrando a alta capacidade adaptativa desta espécie (BRITO, 2017; MARTINS et al., 2017; HOMMA et al., 2005; NETO DE SÁ et al., 2011; OLIVEIRA, 2017; RIBEIRO et al., 2013). A ocorrência desta praga foi relatada nos estados do Pará (Região Norte); Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Alagoas, Pernambuco, Sergipe e Bahia (Região Nordeste); Rio de Janeiro e Minas Gerais (Região Sudeste) e Rio Grande do Sul (Região Sul) (BRITO, 2017; FERREIRA et al., 1998; MARTINS et al., 2017; NETO DE SÁ et al., 2011; OLIVEIRA, 2017; SILVA et al., 1968).

No norte do Brasil, a alta incidência de *O. invirae*, conhecida como lagarta-desfolhadora-das-palmeiras, tem causado severos danos aos cultivos comerciais de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) e palma de óleo ou dendezeiro (*Elaeis guineenses* Jacq.). Em palmeiras nativas como açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), jerivá (*Syagrus romanzoffianum*), carnaúba (*Copernicia cerifera*) e butiazeiro (*Butia eriospatha*), além de palmeiras ornamentais como palmeira imperial (*Roystonea oleraceae*), palmeira-de-leque (*Livistona rotundifolia*) e palmeira-de-leque-da-Austrália (*Livistona australis*) também há registro de ataques, bem como em plantas da família Musaceae, a exemplo da bananeira (*Musa paradisiaca*) (FERREIRA et al., 2015; HOMMA et al., 2005).

No Brasil, além de *O. invirae*, há registros das espécies *O. quiteria meridionalis* Staudinger, 1877, nas regiões da Mata Atlântica do sul da Bahia (DA NEVES, 2016) e no estado de Santa Catarina (CASAGRANDE; MIELKE, 2005), e *O. cassiae* (Linnaeus, 1758), na região de Mata Atlântica no Rio Grande do Norte. A

subespécie *O. invirae amplificatus* Stichel, 1904, foi relatada no Rio Grande do Sul (SALGADO-NETO; LOPES-DA-SILVA, 2011).

2.1.2 Aspectos biológicos e comportamentais

O adulto de *O. invirae* é uma borboleta frugívora, de hábito diurno e vôo alto e rápido. O macho mede cerca de 6 a 8 cm e a fêmea, 7 a 8,5 cm de envergadura. Suas asas são de cor marrom na extremidade e marrom-avermelhada na base. As asas anteriores possuem uma larga faixa de coloração amarelo-alaranjada, com ângulo apical marcado por duas machas brancas, e asas posteriores levemente dentadas, com faixa circular amarela (Figura 1) (NETO DE SÁ et al., 2011; FERREIRA et al., 1998).

Figura 1 - Adultos de *Opsiphanes invirae* (Lepidoptera: Nymphalidae): (A) fêmea e (B) macho.

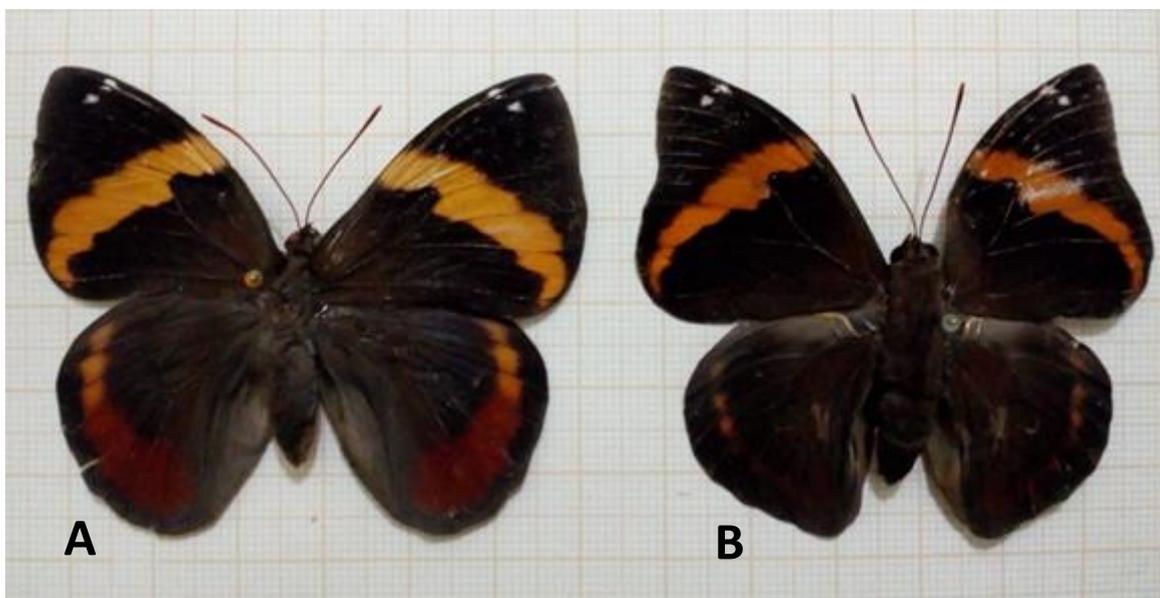
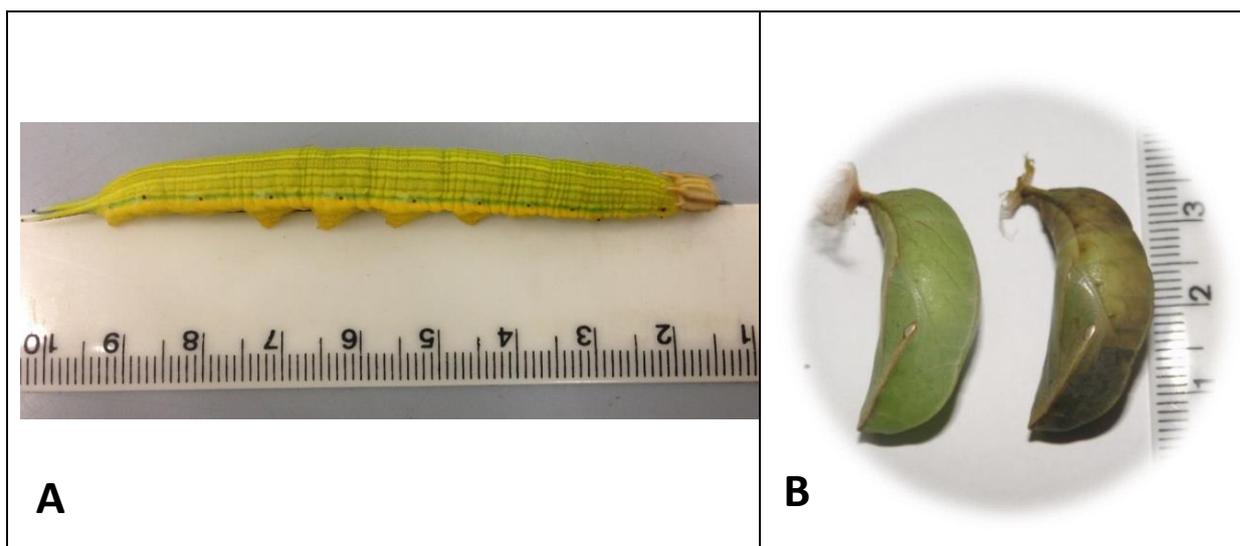


Foto: Jakeline Santos, 2018.

Em geral, o tamanho das fêmeas é superior ao dos machos (FERREIRA; LINS, 2006). Esta difere do macho por apresentar coloração mais clara e maior largura da faixa amarela nas asas anteriores. O macho apresenta, na asa anterior, faixa transversal mais estreita (Figura1) (FERREIRA et al.,1998).

A lagarta de *O. invirae* comumente se encontra na face inferior dos folíolos, por cima de uma secreção fina sedosa, tornando-se quase imperceptível em virtude de sua coloração verde. Possui o corpo verde com faixas longitudinais claras, apêndices cefálicos em forma de espinho e extremidade do corpo bifurcada. Em seu último instar mede cerca de 10,0 cm de comprimento (Figura 2A) (FERREIRA et al., 2015; NETO DE SÁ et al., 2011). A pupa de *O. invirae* é inicialmente de cor verde-clara brilhante, mudando para a cor marrom apresentando listras transversais e longitudinais róseo-ferrugem. Apresenta em sua região cefálica duas pequenas manchas douradas, e mede cerca de 35 mm a 40 mm de comprimento (Figura 2B) (FERREIRA, 2012; FERREIRA; LINS, 2006; HOMMA et al., 2005). Com a proximidade da fase de pupa, as lagartas se deslocam em busca de local para pupar, ficando dependurada em algum local da planta até emergência do adulto, em geral nos folíolos próximo ao estipe. Quando em alta infestação, é possível observar pupas ao longo do estipe, e em plantas de cobertura para solo (HOMMA et al., 2005; TINÔCO, 2016).

Figura 2 – Lagarta e crisálida de *Opsiphanes invirae* (Lepidoptera: Nymphalidae): (A) lagarta no último instar; (B) crisálida sadia (esquerda) e parasitada (direita)



Fonte: Autora, 2018. Escala real.

Segundo Ferreira (2006), o ciclo de vida de *O. invirae* tem duração de 59 a 77 dias. A fase de ovo dura de 8 a 10 dias; a de lagarta, que possui quatro ecdises, possui duração de 36 a 47 dias e, a fase de pupa, cerca de 15 a 20 dias (Figura 3).

Figura 3 - Ciclo biológico de *Opisiphanes invirae* (Lepidoptera: Nymphalidae)

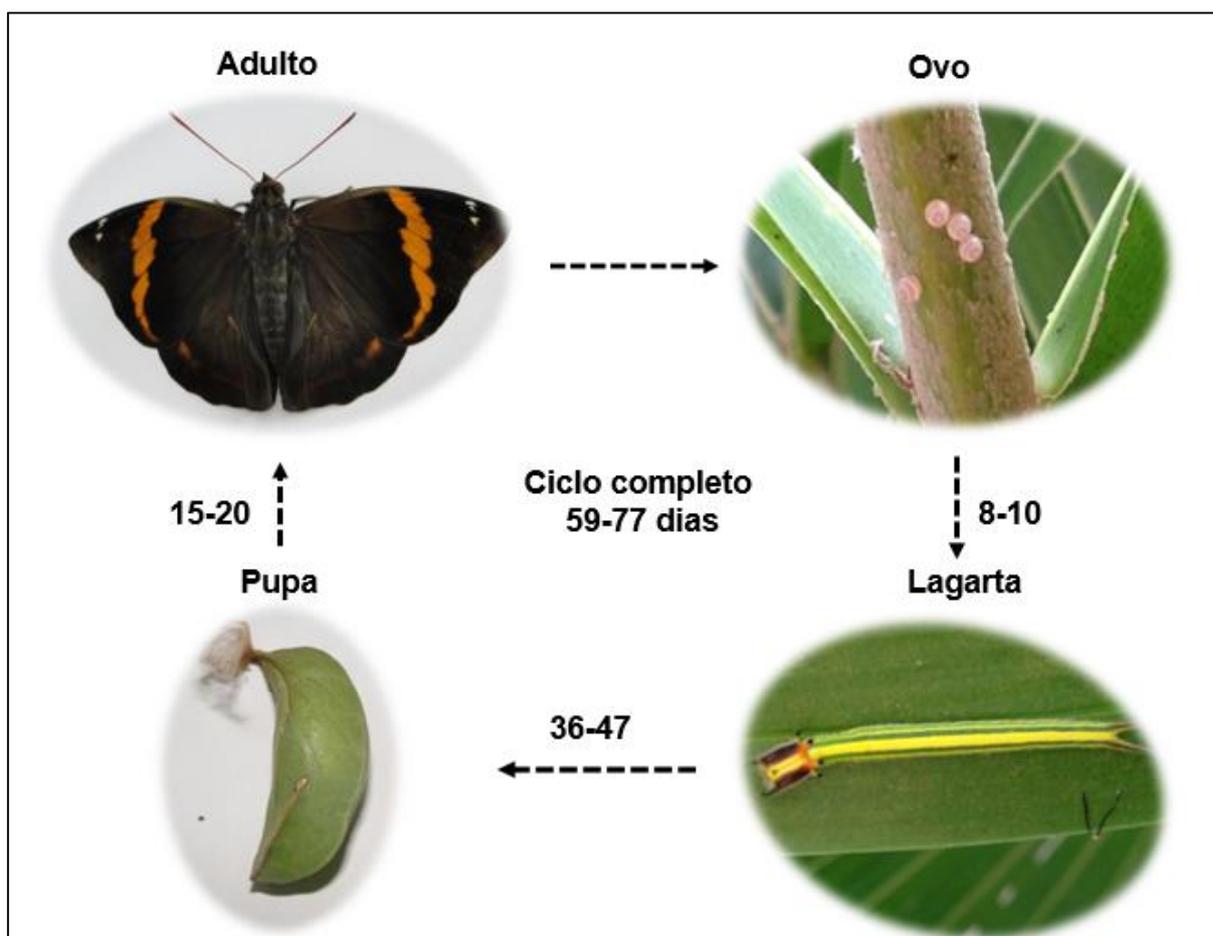


Foto: Autora, 2018.

Os ovos, de maneira geral são colocados em posturas individuais, podendo ser encontrados de dois a três ovos em conjunto no folíolo. As cores dos ovos variam de cinza claro leitoso a leitoso com linhas pretas e vermelhas, possivelmente em função do desenvolvimento do embrião no interior do ovo. (FERREIRA, 2006; TINÔCO, 2016)

Em plantios de palma de óleo, o ciclo desta espécie no campo ocorre a cada dois meses, totalizando seis gerações ao longo do ano (TINÔCO, 2016).

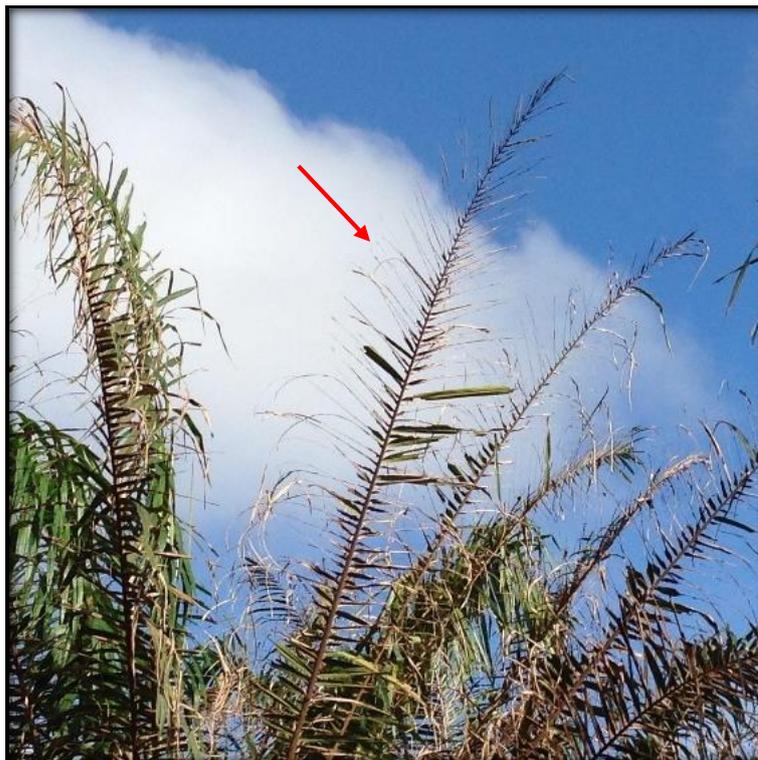
2.1.3 Danos e importância econômica

No estágio larval de *O. invirae*, esta alimenta-se de folhas, destruindo o limbo foliar, das bordas para o centro, causando sérios danos em suas plantas hospedeiras (NETO DE SÁ et al., 2011; HOMA et al., 2005) (Figura 4). O desfolhamento afeta a transpiração e a fotossíntese da planta, atrasando o desenvolvimento e reduzindo a produtividade (FERREIRA; LINS, 2006).

Uma larva de *O. invirae* é capaz de consumir até 800 cm² de folha, representando uma redução significativa da área foliar, que em casos severos, pode levar à morte da palmeira (BRANDÃO et al., 2017; LEMOS; BOARI, 2010). Pode ser considerada uma praga perigosa por atingir uma alta repentinamente, e pela voracidade de suas larvas (FERREIRA; LINS, 2006). A infestação ocorre inicialmente na periferia do plantio, onde as larvas se dispersam passando de uma planta para outra, causando assim, infestação em toda a área (BRANDÃO et al., 2017). Dentre as injúrias do ataque das larvas são observados destruição do limbo foliar, ficando apenas as nervuras centrais, anormalidade no desenvolvimento e redução de tamanho dos cachos das plantas (AGROFIT, 2003).

No norte do Brasil, *O. invirae* é uma importante praga das culturas da palma de óleo e coco, pelo frequente ataques a estes plantios (HOMA et al., 2005). Os surtos populacionais desta praga podem ser um entrave para a produtividade destas culturas, especialmente pelos danos econômicos que podem causar (LEMOS; BOARI, 2010; RIBEIRO et al., 2010).

Figura 4 - Dano provocado pela lagarta de *Opisiphanes invirae* (Lepidoptera: Nymphalidae) em plantas de palma de óleo (*Elaeis guineenses*)



Fonte: Autora, 2018.

2.2 Monitoramento de *O. invirae*

O monitoramento do adulto de *O. invirae* no plantio de coqueiro ocorre com uso de armadilhas confeccionadas com recipientes plásticos, contendo o atrativo alimentar melaço da cana-de-açúcar (Figura 5A). Atualmente o uso destas armadilhas é a medida mais eficiente para o monitoramento e auxílio na redução da população da praga, a depender da densidade populacional e do quantitativo de armadilhas. A armadilha tipo “caça-borboleta”, possui uma abertura para entrada e pouso de um grande número de insetos adultos. A captura das borboletas ocorre à medida que estas são atraídas e ficam presas ao pousarem no melaço, e morrem. O monitoramento deve ser diário visando a remoção dos insetos capturados com auxílio de uma espátula, e reposição do atraente alimentar, quando necessário (FERREIRA et al., 2015).

No estágio larval, o monitoramento de *O. invirae* nas culturas do coqueiro e palma de óleo, ocorre com uso do bioinseticida à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Dipel®, Thuricide®, Bac-control® e Agree®) (FERREIRA et al., 2015;

SILVA et al., 2015; TINÔCO, 2008). Para uso do produto Dipel®, o nível de dano econômico considerado na cultura do dendê para utilização nas formulações WP e SC, é de 5,14-2,98 lagartas por folha, respectivamente (TINÔCO, 2016). A aplicação com bioinseticida é recomendada nas horas mais a mena do dia, preferencialmente à tarde. A morte das lagartas não ocorre de imediato, como nos inseticidas sintéticos, cessando a movimentação e a alimentação somente após 3 a 4 dias (FERREIRA et al., 2015).

2.3 Controle de *O. invirae*

2.3.1 Controle Massal de *O. invirae*

A metodologia mais utilizada para redução da população de adultos de *O. invirae* ocorre com o uso de armadilhas confeccionadas com sacos plásticos, contendo melaço de cana-de-açúcar como atrativo alimentar e em alguns casos adicionada de solução inseticida (LEMOS; BOARI, 2010; FERREIRA et al., 2015).

Na captura massal dos adultos de *O. invirae*, estas armadilhas são distribuídas em todo o plantio, contendo uma abertura para entrada dos insetos adultos (Figura 5B). A armadilha em sacola plástica consiste basicamente em um saco de plástico transparente (1 m x 0,60 m), onde a entrada da armadilha é mantida parcialmente aberta por um laço de arame oval, através do qual as borboletas entram, mas não conseguem sair, ficando presas à sacola. Dentro desta, contém uma garrafa de plástico com pequenas aberturas, contendo a isca atrativa, que pode ser o melaço puro ou a mistura de melaço com água. As armadilhas são suspensas no estipe da planta a uma altura de aproximadamente 150 cm do solo (LORIA et al., 2002). Entre suas vantagens adicionais, estão a possibilidade de seguir a dinâmica da população da praga e o fato de não usar inseticidas (CHINCHILLA, 2003).

Figura 5 - Armadilhas utilizadas em campo para captura de *O. invirae* contendo melado da cana-de-açúcar



Fonte: A) Autora, 2018; B) Jakeline Santos, 2018.

LEGENDA

A) recipiente plástico;

B) saco plástico;

2.3.2 Controle Biológico de *O. invirae*

O controle biológico é um dos pilares de sustentação dos programas de Manejo Integrado de Pragas, que em conjunto com outros métodos, torna-se uma importante medida de controle para manutenção da população de pragas abaixo do nível de dano econômico (PARRA et al., 2002). Considerado um componente-chave de combate a pragas resistentes a inseticidas, retirada de produtos químicos e redução do uso de pesticidas em agroecossistemas (BALE et al., 2008).

No manejo de *O. invirae*, aplicações do produto comercial Dipel® à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*, mais descrito como Bt, tem sido recomendado aos cultivos de coqueiro, palma de óleo e bananeira como estratégia para redução da população desta espécie-praga (AGROFIT, 2003; BRASIL, 2010; SILVA et al., 2015; TINÔCO, 2016). A bactéria Bt é reconhecida como um excelente entomopatógeno para uso em culturas comerciais, sendo bastante utilizada por sua toxicidade aos insetos (PORTELA-DUSSÁN et al., 2013). Esta toxicidade advém da sua capacidade de produzir cristais durante seu processo de esporulação, e sobretudo pela formação de poros na membrana plasmática do intestino médio dos insetos suscetíveis, causando assim, a lise celular (SCHNEPF et al., 1998; VACHON, LAPRADE; SCHUARTZ, 2012).

A recomendação para o controle de *O. invirae* é a preparação de uma solução com 300g do produto comercial Dipel diluídos em 100 litros de água, pulverizados na área atacada (BARCELOS et al., 1995; TINÔCO, 2016). A eficiência do uso do inseticida biológico Bt para o controle de *O. invirae* está associada ao momento correto de aplicação, pois em lagartas com instares mais avançados, existe maior ingestão das partículas tóxicas que se encontram nas folhas pulverizadas, e conseqüentemente na redução da geração seguinte (FERREIRA et al., 2015). Uma das principais vantagens do uso deste bioinseticida, é sua especificidade. Em contrapartida, sua baixa persistência em campo, tornou-se um dos principais entraves para seu uso em larga escala (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; POLANCZYK et al., 2006).

No Brasil, agentes de controle biológico de *O. invirae* têm sido relatados. Dentre esses inimigos naturais estão os predadores de lagartas, *Alcaeorrhynchus grandis* (Hemiptera: Pentatomidae) e formigas do gênero *Wasmannia* (Hymenoptera: Formicidae); parasitoides de pupa como *Trichospilus diatreae* (Hymenoptera: Eulophidae) e *Conura maculata* (Hymenoptera: Chalcididae); infecções por fungos do gênero *Paecilomyces* e *Iflavirus* isolado de imaturos de *O. invirae*, nomeado *Opsiphanes invirae Iflavirus 1* (OilV-1). Destacam-se dentre estes organismos, o predador natural *A. grandis*, o parasitoide *C. maculata* e os agentes entomopatogênicos relatados como organismos com potencial para uso na supressão da população da espécie *O. invirae* (RIBEIRO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2013; SALGADO-NETO; LOPES-DA-SILVA, 2011; SILVA et al., 2015; TINÔCO, 2016).

2.4 Controle mediado por semioquímicos

Os insetos utilizam as informações químicas no ambiente em todos os estágios de seu desenvolvimento, para localização de recursos alimentares, oviposição e hibernação, para se unirem aos coespecíficos, acasalamento, defesa, reconhecimento de habitats ou hospedeiros (AGELOPOULOS et al., 1999). Estas informações químicas são denominadas de semioquímicos (sinais químicos), que são os compostos produzidos naturalmente pelos insetos que regem todos os aspectos do seu comportamento (EL-SAYED et al., 2006).

O conhecimento dos semioquímicos e suas interações fazem parte das pesquisas em ecologia química, que contribui para a compreensão do comportamento, desenvolvimento e evolução dos organismos. De forma prática, fornece a base para o uso bem-sucedido de produtos semioquímicos para o controle de pragas como alternativa ao amplo uso de inseticidas (AGELOPOULOS et al., 1999; EVENDEN; SILK, 2016).

Os semioquímicos foram classificados em várias categorias funcionais com base no tipo de interação, se intraespecífica ou interespecífica, e com base nos custos e benefícios que cada organismo da interação terá: denomina-se feromônio para os compostos que mediam as relações entre indivíduos da mesma espécie (ação intraespecífica) e aleloquímicos para os sinais químicos que mediam as interações entre indivíduos de espécies diferentes (ação interespecífica) (EVENDEN; SILK, 2016; VILELA; DELLA LUCIA, 2001).

2.4.1 Uso de Feromônios Sexuais no MIP

Os feromônios podem ser definidos como “substâncias, que são secretadas para o exterior por um indivíduo e, quando percebidas por um segundo indivíduo da mesma espécie, desencadeiam uma resposta específica” (KARLSON; LÜSCHER, 1959; ZARBIN et al., 2007). São conhecidos como substâncias mensageiras entre os indivíduos, e secretados por muitos insetos, elicitando respostas comportamentais em espécies coespecíficas (VILELA; DELLA LUCIA, 2001; KIRSCH, 1988).

Os compostos voláteis resultam da atividade metabólica de cada organismo, onde pequenas diferenças genéticas, dietéticas e ambientais, tornam improvável que dois organismos produzam a mesma mistura de compostos orgânicos voláteis. Em geral os grupos de odores são específicos de cada espécie, indicando o sexo e outras informações intraespecíficas (REGNIER; LAW, 1968).

Os feromônios sexuais são os responsáveis pela atração entre os sexos opostos, para fins de acasalamento (VILELA, 1992). Dentre os semioquímicos, os feromônios sexuais são de longe os mais estudados, com identificação em diversas ordens de inseto (GINZEL, 2010). Os registros de maior sucesso são os feromônios sexuais de lepidópteros e os de agregação dos coleópteros (HOWSE et al., 1996). Os feromônios em geral, são misturas de vários componentes, majoritários e

minoritários, fundamentais para obtenção do comportamento reprodutivo (ALTSTEIN, 2004).

No manejo integrado de pragas, o uso dos feromônios tem sido utilizado principalmente nos sistemas de monitoramento e nas técnicas de controle: interrupção do acasalamento e captura massal (ZARBIN et al., 2007).

O monitoramento faz uso de armadilhas com feromônio para determinar a presença e densidade da praga em campo, visando determinar quando a população do inseto-praga atingiu o nível de dano econômico, indicando o momento de controle e redução do uso desnecessário de inseticida. São úteis para alertar o produtor sobre a incidência de pragas e definir áreas de infestação (TREMATERRA, 1997; ZARBIN; RODRIGUES, 2009).

No monitoramento, o uso do feromônio sexual da mariposa da ervilha, *Cydia nigricana* (Lepidoptera: Tortricidae), tem sido um bom exemplo do estabelecimento desta tecnologia para o sistema de manejo desta espécie-praga. O monitoramento desta mariposa ocorre em áreas menores que 50 ha, com uso de duas armadilhas contendo feromônio, mantidas distantes, e vistoriadas a cada dois dias. Quando as armadilhas apresentam uma captura acima de 10 ou mais mariposas, em dias consecutivos, indicam o nível de controle (GOULART et al., 2015; HOWSE et al., 1996). As armadilhas iscadas com feromônio possuem importantes características, como a sensibilidade e seletividade, tornando-se excelentes instrumentos no manejo de pragas, para detecção da presença do inseto-praga e monitoramento da fenologia do horário de vôo (WITZGALL et al., 2008).

Na técnica do confundimento ou interrupção do acasalamento existe uma interferência ou forte bloqueio da transmissão de sinais entre os parceiros sexuais. O confundimento ocorre com liberação do feromônio sintético na área objeto de controle para diminuir ou impedir a habilidade dos insetos de localizar seu parceiro, reduzindo o acasalamento e conseqüentemente, a população de pragas (BENTO, 2001). Esta técnica provoca desorientação e interrupção da comunicação entre os sexos, atrasando, reduzindo ou evitando a fertilização de fêmeas (WITZGALL et al., 2010).

O uso de feromônios sexuais em sistemas de interrupção do acasalamento e armadilha em massa foram implementadas com sucesso em programas de manejo de muitas espécies de pragas, notadamente em lepidópteros. Witzgall (2008) relata sobre o aumento da eficácia do sistema de interrupção do acasalamento com o uso

a longo prazo para a redução significativa das populações, diversamente ao que ocorre com o uso de inseticidas. Desta forma, o sistema de interrupção do acasalamento tem permitido um controle sustentável e confiável para os produtores.

Na coleta massal faz-se uso dos feromônios sintéticos e atrativos alimentares como iscas para atração dos insetos-alvos para uma armadilha, com intuito de captura e mortalidade (EL-SAYED et al., 2006). O objetivo é a captura seletiva de um número significativo de insetos-praga alvo, em uma grande quantidade de armadilhas, visando manter sua população abaixo do nível de dano econômico (BENTO, 2001). A aniquilação em grande quantidade, por armadilhamento em massa ou atrai-e-mata, depende da atração de um ou ambos os sexos em uma isca, em combinação com uma armadilha de grande capacidade ou um alvo impregnado com inseticida. Para uso desta técnica, é necessária uma potente atração dos insetos, ao contrário da detecção e monitoramento, que requer somente uma pequena proporção da população para amostragem (WITZGALL et al., 2010).

A técnica de armadilhagem em massa e monitoramento, possui em conjunto uma produção de iscas anual na casa de dezenas de milhões, abrangendo ao menos 10 milhões de hectares (WITZGALL et al., 2010). Um exemplo de sucesso com essa técnica no Brasil e na América tropical, é o feromônio de agregação do *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae), o Rincoforol. Esta praga é muito importante em palmeiras, como o coqueiro e a palma-de-óleo, pelos danos diretos que causa às plantas e por ser o principal vetor do nematoide causador do anel vermelho, *Bursaphelenchus cocophilus* (Aphelencooidade). Atualmente, a medida mais eficiente para controle deste inseto-praga é o uso da técnica de armadilha em massa, tipo balde, iscada com o Rincoforol e potencializada com um atraente alimentar, como a cana-de-açúcar (OEHLSCHLAGER et al., 1993; NAVARRO et al., 2002). Podemos destacar ainda, os feromônios da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae); da broca do café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae); da traça do tomateiro, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: gelechiidae) e da broca da raiz da cana-de-açúcar, *Migdolus fryanus* (Coleoptera: Vesperidae), como exemplos de feromônios comercializados para fins de controle massal no mercado brasileiro (GOULART et al., 2015).

Grande parte dos estudos com semioquímicos são motivados pelo interesse em explorá-los como elemento no Manejo Integrado de Pragas (MIP). A importância destes se dá pela necessidade de maior compreensão do comportamento dos

insetos mediado por sinais químicos, e pelas perspectivas de significativas contribuições ao surgimento de novos métodos racionais de controle (GINZEL, 2010).

O uso de feromônios sexuais tem proporcionado vantagens significativas na redução de custos e ao meio ambiente, favorecendo não somente o produtor, como também o consumidor, e toda a sociedade (ZARBIN et al., 2007). Paralelo a isto, além dos componentes do feromônio serem específicos de cada espécie, apresentam-se como ferramentas seguras para os organismos benéficos, mostrando-se ideias aos programas de manejo de pragas (BENTO et al., 2016).

2.4.2 Feromônios sexuais de Lepidópteros

Os feromônios de lepidópteros foram os primeiros a ser amplamente estudados, possuindo uma extensa lista, destacando-se os obtidos de fêmeas (GANAI et al., 2017). O primeiro feromônio sexual identificado foi o da mariposa do bicho-da-seda, *Bombyx mori* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Bombycidae), denominado Bombicol (BUTENANDT et al., 1959). Após esta descoberta, feromônios de mais de 500 espécies de insetos foram identificados e introduzidos na agricultura como agentes de controle de pragas (UJVÁRY, 2010).

No Brasil, os primeiros feromônios sexuais identificados de insetos-pragas de interesse comercial foram os das mariposas *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) em 1966 (ZARBIN; RODRIGUES, 2009). Embora os feromônios sexuais provenientes das fêmeas sejam os mais conhecidos pela ocasião da identificação de mais de 150 espécies de insetos, sabe-se que estes também podem ser liberados pelos insetos machos, com dados de aproximadamente 50 espécies relatadas (GANAI et al., 2017)

2.4.3 Feromônios sexuais de macho em lepidóptera

Os lepidópteros adultos possuem basicamente, além das glândulas que pertencem fisiologicamente ao duto digestivo, somente glândulas odoríferas sexuais ligadas à esfera sexual, através da emissão de odores das fêmeas para atração dos machos, ou pela liberação de aromas estimulantes dos machos para as fêmeas (BARTH, 1980). O feromônio sexual feminino tem o potencial de estimular os

machos para cópula com sua atuação a longas distâncias. Já o feromônio sexual masculino, possui como característica, o fato de atuar a curtas distâncias, favorecendo a aceitação da fêmea para cópula (GANAI et al., 2017).

Nas borboletas, além do aspecto visual, a escolha do parceiro é influenciada por elementos olfativos, fundamentais a um curto alcance (RAUSER; RUTOWSKI, 2003).

Existe uma diversidade de estruturas que emitem aromas afrodisíacos em lepidópteros, conhecidas como estruturas cuticulares epidérmicas especializadas, e muitas vezes ligadas às células glandulares, chamadas de órgãos androconias. Estes variam de forma, indo desde escamas especializadas nas asas, a tufo de pêlos (“hairpencil”), localizados no abdome, pernas e tórax (BOPRÉ, 1989; ROELOF, CARDÈ, 1977; SCUDDER, 1877). Em algumas borboletas das famílias Nymphalidae e Pieridae, a produção dos aromas ocorre em glândulas odoríferas presentes nos machos, onde a dispersão destes odores acontece através de escamas especializadas, as androcônias, que estão presentes nas asas anterior e posterior destes insetos. Em muitas espécies, os aromas, ou feromônios, usados pelos machos para o cortejo de fêmeas, são perceptíveis aos humanos (Tabela 1) (ANDERSON et al., 2007; BARTH, 1980; GANAI et al., 2017; RAUSER; RUTOWSKI, 2003; YILDIZHAN et al., 2009).

Tabela 1 - Espécies de insetos machos que emitem aromas perceptíveis aos humanos e qualificados de acordo com o tipo de odor (BARTH, 1980)

Família	Espécie	Classificação	Localização das glândulas	Qualidade do cheiro
Nymphalidae	<i>Opsiphanes invirae isagoras</i> (seg. Barth, 1952a)	Borboleta	Placas glandulares nos quarto e quinto segmentos abdominais	Agradável como baunilha
Pieridae	<i>Pieris brassicae</i> e outras espécies de Pieridae (seg. vários autores)	Borboleta	Escamas odoríferas na face superior de ambas as asas	Aromático, ácido, agradável como certas plantas (Melissa ou Citrus)
Lycaenidae	Lycaenidae, várias espécies (<i>Thecla athys</i>) (seg. vários autores)	Borboleta	Escamas odoríferas na face superior da asa anterior	Desagradável
Pyralidae	<i>Galleria mellonella</i> (seg Barth, 1937)	Mariposa	Dobra glandular de asa anterior	Fortemente aromático, como seiva de <i>Petasites offic.</i> (Composta)
Sphingidae	Sphingidae, numerosas espécies (seg. vários autores)	Mariposa	Segundo segmento do abdômen	Desagradável, como carne em decomposição ou morcegos
Eribidae	<i>Erebus odorathus</i> (seg. Barth, 1952b)	Mariposa	Tíbia posterior	Agradável como mel
Nymphalidae	<i>Caligo arisbe</i> (seg. Barth, 1953)	Borboleta	Placas glandulares nos quarto e quinto segmentos abdominais	Duas qualidades - em material vivo: agradável; quando morto: como gordura rançosa
Arctiidae Ctenuchidae	Arctiidae e Ctenuchidae (várias espécies) (seg. Barth, 1956)	Mariposa	Tubos abdominais	Em geral desagradável como gordura rançosa ou camiça
Noctuidae	Noctuidae - Hadeninae (várias espécies) (observações próprias)	Mariposa	Primeiros segmentos de abdômen	Agradável como canela, orquídeas, baunilha, etc.
Geometridae	<i>Sphacelodes vulneraria</i> seg. Barth, 1955)	Mariposa	Glândula do harpago	Agradável como baunilha
Geometridae	<i>Anisodes gigantula</i> (seg. Barth, 1955)	Mariposa	Glândula na coxa posterior	Cheiro forte de almíscar

Adaptado: Autora, 2018.

Andersson e colaboradores (2007) relatam que em função das escamas odoríferas (adrocônias) se mostrarem limitadas apenas ao sexo masculino, parece razoável supor que os odores emitidos por machos, desempenha um papel no comportamento de cortejo, e aliado a isto, as observações comportamentais em diferentes espécies, revelam ainda, o uso ativo das estruturas de emissão de odores pelos machos, ao cortejo das fêmeas.

Nos machos da borboleta *Danaus gilippus berenice* (Lepidoptera: Nymphalidae), o comportamento sexual evidencia o uso de órgãos androconiais na disseminação dos odores dos machos sobre as antenas das fêmeas. Os dois órgãos androconiais de *Danaus* estão presentes nas asas e região do abdome (“hairpencil”), mostrando-se especializados na liberação de aromas (BROWER et al., 1965; YILDIZHAN et al., 2009). Posteriormente, concluíram que machos de *Danaus* fazem uso de feromônio no seu comportamento de acasalamento (BUTLER, 1967; PLISKE; EISNER, 1969).

Nieberding e colaboradores (2008) após determinarem a composição química do feromônio sexual masculino na borboleta africana *Bicyclus anynana* (Lepidoptera: Nymphalidae), comprovaram em condições de semi-campo, a influência da taxa de liberação do feromônio no sucesso do acasalamento. Demonstraram que em quantidades artificialmente reduzidas de feromônio, era observado diminuição no acasalamento, e em doses maiores, o processo de cópula era restabelecido. Concluindo que a presença do feromônio nas quantidades adequadas é indispensável no processo de comunicação intraespecífica do inseto.

Na borboleta *Ithominae* (Lepidoptera: Nymphalidae), os alcaloides de pirrolizidina (PAs), classe típica de metabólitos secundários de plantas, são sequestrados da planta e, além de serem usados na defesa química contra predadores, também são utilizados como precursores biossintéticos do feromônio sexual masculino desta espécie (HONDA et al., 2016; TRIGO; BARATA; BROWN, 1994). Para Boppré (1990) existe uma dependência das PAs para aptidão desses insetos, podendo atuar ainda, como reguladores do desenvolvimento de órgãos androconiais.

Machos de *Pieris napi* (Lepidoptera: Pieridae), são borboletas conhecidas por liberar um cheiro forte de citral (geranial e neral) ao interagir com machos e fêmeas coespecíficas. As fêmeas desta espécie mostraram alta sensibilidade ao citral em

testes eletroantegráficos, fornecendo assim, fortes evidências que esta substância funciona como um feromônio sexual masculino (ANDERSSON et al., 2007).

Nas asas do macho da borboleta de *Colias eurytheme* (Lepidoptera: Pieridae), o composto identificado como 13-metilheptacosano, além de possuir atividade eletrofisiológica significativa, mostrou possuir atividade afrodisíaca, indicando forte evidência de que os compostos naturais são importantes sinais no comportamento de acasalamento (GRULA; MCCHESENEY; TAYLOR, 1980).

Além destes, outros ninfalídeos evidenciam a influência de um ou mais compostos no comportamento de aceitação da fêmea para o acasalamento em borboletas como: *Idea leucone* (Lepidoptera: Nymphalidae), onde as secreções do tufo de pêlos abdominal (viridifloric β -lactone e danaidone) induziram respostas significativas às antenas das fêmeas, demonstrando sua ação como feromônio sexual masculino para aceitação da fêmea (NISHIDA et al., 1996). Em *Parantica sita* (Lepidoptera: Nymphalidae), os compostos identificados como prováveiss constituintes da mistura feromonal desta espécie, e liberados através do “hairpencil”, desempenha um papel primordial nas interações aéreas pré-copulatórias entre os sexos (HONDA et al., 2016).

Para Barth (1980), as secreções emitidas pelos lepidópteros podem ser diferenciadas de acordo com seu efeito fisiológico: animais com glândulas atraentes, que atraem o sexo oposto, e animais com glândulas estimulantes, que emitem secreções que estimulam o sexo oposto a não fugir da cópula. Como em geral o inseto ativo é o macho, e o passivo a fêmea. Logo as glândulas presentes nos machos são estimulantes, e nas fêmeas, atraentes.

3 COMPORTAMENTO SEXUAL E MORFOLOGIA DA ANTENA DE *OPSIPHANES INVIRAE*

Resumo

A lagarta desfolhadora *Opsiphanes invirae* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Nymphalidae) é uma borboleta neotropical de importante impacto em Arecáceas, como o coqueiro e a palma de óleo. Os surtos populacionais desta espécie podem ser um entrave para a produtividade destas culturas, especialmente pelos danos econômicos que podem causar. Compreender a bionomia e a etologia de um inseto, em busca de uma medida de controle é essencial no manejo de pragas. A comunicação química em borboletas recebeu pouca atenção contrastando com as mariposas, e pesquisas sobre a morfologia de suas antenas ainda são limitadas. Em *O. invirae*, não há relatos da comunicação sexual e estruturas envolvidas na comunicação desses insetos. Conhecer o comportamento dos insetos e como funciona o sistema de comunicação da espécie-praga, é de grande importância para o aperfeiçoamento e desempenho da tecnologia dos feromônios no manejo integrado de pragas (MIP). Diante de tais fatores, nosso objetivo neste estudo foi investigar estruturas morfológicas associadas a produção de feromônio, descrever o comportamento e a morfologia da antena de *O. invirae*, evidenciando a presença e recepção de feromônios sexuais. Verificou-se um dimorfismo marcante nesta espécie, com a identificação das androcônias, através da presença de áreas glandulares e pincéis de pelos nas regiões odoríferas do abdome e asas posteriores dos machos, ausentes em fêmea. As observações do horário de atividade reprodutiva dos insetos ocorreram em condições de campo em plantios de coqueiro (na fazenda Sococo) e palma de óleo (na Agropalma S/A), ambas no estado do Pará. A descrição da atividade comportamental dos insetos foi realizada em condições de semi-campo na Universidade Federal de Alagoas (UFAL). A atividade sexual de *O. invirae* foi caracterizada pelos comportamentos de corte de ambos os sexos, a pré-cópula com a disseminação do feromônio afrodisíaco masculino para estímulo sexual das fêmeas, e cópula. A análise morfológica das antenas de machos e fêmeas permitiu identificar seis tipos de sensilas: dois tipos de sensilas tricoides, três tipos de sensilas caéticas, sensilas coleocônicas, sensilas esquamiformes, sensilas aurículas e sensilas de Bohm. As caracterizações comportamentais e morfológicas realizadas neste estudo evidenciam a comunicação química mediada por substâncias com função de feromônios entre os insetos.

Palavras-chave: *Opsiphanes invirae*. Lagarta desfolhadora. Semioquímicos. Dimorfismo sexual. Sensila. Microscopia eletrônica de varredura.

3.1 Introdução

A lagarta desfolhadora *O. invirae* é uma borboleta neotropical com até seis gerações por ano (TINÔCO, 2016). É uma praga chave de culturas de importância econômica da família Arecaceae (FERREIRA et al., 2015). No norte do Brasil, a alta incidência da *O. invirae*, também conhecida como lagarta-desfolhadora-das-palmeiras, tem causado severos danos aos cultivos comerciais de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) e palma de óleo ou dendezeiro (*Elaeis guineenses* Jacq.) (BRANDÃO et al., 2017; HOMA et al., 2007; NETO DE SÁ et al., 2011).

Compreender a bionomia e a etologia de um inseto, em busca de uma medida de controle é essencial no manejo de pragas (KUMARA et al., 2016). Técnicas alternativas de controle comportamental, como a aplicação de feromônios sexuais, tornaram-se cada vez mais importantes (WITZGALL; KIRSCH; CORK, 2010; XIANGQUN et al., 2014). Feromônios sexuais são substâncias emitidas por um sexo, geralmente fêmeas, em baixa quantidade, e são percebidos pelo sexo oposto, provocando respostas comportamentais complexas, incluindo busca e acasalamento de parceiros (UJVÁRY, 2010). Em borboletas são os machos os responsáveis pela liberação do feromônio e localização das fêmeas baseado-se em pistas visuais e feromônios de curto alcance (SARTO I MONTEYS et al., 2012; YILDIZHAN et al., 2009). Os estudos comportamentais têm sido importantes para uso de feromônios sexuais. O conhecimento do sistema de comunicação da espécie-pragas, permite por exemplo, uma melhor interpretação dos dados provenientes de campo, referente à captura em armadilhas iscadas com feromônio, bem como, a interrupção no acasalamento (LIMA.; DELLA LUCIA, 2001). Compreender o comportamento sexual do inseto, reúne, portanto, informações relevantes para o melhor desempenho da tecnologia de feromônios no MIP.

A comunicação química em borboletas recebeu pouca atenção em relação às mariposas (DARRAGH et al., 2017; SARTO I MONTEYS et al., 2012) e pesquisas sobre a morfologia de suas antenas ainda são limitadas (XIANGQUN et al., 2014). São nas antenas, principal órgão olfatório destes insetos, que estão presentes as sensilas contendo células olfativas, cuja função é a detecção de odores (HANSSON, 1995). Biologicamente, é através do sistema olfativo que os feromônios influenciam o comportamento dos insetos (UJVÁRY, 2010). O conhecimento do sistema olfativo

de lepidópteros, contribuiu para melhor compreensão do funcionamento, e da correlação da morfologia com o comportamento (HANSSON, 1995; MYERS, 1972).

Em virtude destes fatores, os objetivos deste trabalho foram investigar estruturas morfológicas associadas a produção de feromônio, descrever o comportamento de *O. invirae* e investigar morfológicamente a antena desta praga, evidenciando a presença e a recepção de feromônios sexuais. Este estudo pode contribuir com as investigações acerca dos semioquímicos modificadores de comportamento para o manejo sustentável de pragas.

3.2 Materiais e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN) do Centro de Ciências Agrárias-CECA, da Universidade Federal de Alagoas-UFAL (9° 33' 17" S e 35° 46' 33"), no município de Maceió, estado de Alagoas, e nas fazendas com plantio co

mercial da palma de óleo, no Complexo Agropalma S/A (02° 31' 31" S e 48° 45' 7") localizada no município de Tailândia, e de coqueiro, na fazenda Sococo S/A (02° 7' 11" S e 48° 38' 45" W), em Mojú, ambas no estado do Pará.

3.2.1 Coleta e manutenção dos insetos

As pupas de *O. invirae* foram coletadas em plantios de palma de óleo, sendo em seguida encaminhadas para o Laboratório de Fitossanidade da Empresa e posteriormente transportados para o Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN) - UFAL.

As pupas foram mantidas em condições de laboratório com temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$, umidade relativa (UR) de $79\% \pm 1$ e fotoperíodo de 12/12h. Próximo à emergência foi realizada a sexagem, acondicionando-as em gaiolas separadas por sexo. Após emergência, os insetos adultos foram alimentados com solução de melão a 10%, ou com frutas em fermentação, em condições de semi-campo, em um telado com dimensões 1,80 x 3,0 x 2,3 m, a $26 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, UR: $68 \pm 5\%$.

3.2.2 Dimorfismo sexual em *Opsiphanes invirae*

As observações morfológicas das pupas e adultos de *O. invirae* foram determinadas usando microscópio estereoscópico (lupa) e observações diretas. 20 exemplares de ambos os sexos provenientes do estado do Pará foram utilizados para esta análise.

As crisálidas eram acondicionadas em bandejas plásticas e iniciado o processo de sexagem. Quando prestes à emergência era realizada de forma direta, onde a observação era facilitada pelo fato do macho apresentar uma mancha escura na região dos urômeros; quando na fase inicial, ocorria com uso de lupa, na qual era observada a região genital.

Para obtenção dos adultos, as crisálidas eram acondicionadas em gaiolas confeccionadas com tela e madeira, sendo penduradas cuidadosamente, com uso de um grampo, na tela através do fio de seda presente na extremidade da crisálida. Este processo era realizado para garantir a emergência dos insetos virgens de forma saudável, assemelhando-se ao ambiente natural. Após este processo, asas e abdome foram dissecados e analisados.

3.2.3 Análise do comportamento sexual de *O. invirae*

Observações de campo e semi-campo, foram realizadas nas fazendas Agropalma S/A e Sococo S/A e no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN)–UFAL, respectivamente. As observações nas fazendas ocorreram inicialmente entre 5:30 e 19:30 horas, no intuito de verificar o horário de atividade sexual dos insetos. Após a determinação do horário de atividade, as observações se concentraram em condições de semi-campo (telado com dimensões 1,80 x 3,0 x 2,3 m nas condições de temperatura e umidade ambiente) (Figura 6B), para acompanhar o comportamento sexual.

Para avaliação do comportamento dos insetos, foram liberados no telado 7 grupos de 12 fêmeas e 17 machos, de 24 a 48 horas de idade, no horário de atividade sexual, durante sete dias. Destes, 13 casais foram analisados através de filmagens para definir e caracterizar as sequências comportamentais. As filmagens foram realizadas em condições de iluminação natural no intuito de não interferir no comportamento dos insetos. Por dia de observação, foi possível registrar com êxito mais de uma cópula, reunindo imagens para posterior análise. Além das filmagens, observações diretas e contínuas de 13 cópulas, foram realizadas para descrição do comportamento de corte, pré-cópula e cópula de machos e fêmea, de forma detalhada.

Neste período, os insetos foram alimentados com solução de melão a 15% (Figura 6A). As observações foram registradas com auxílio de uma filmadora Sony (AVCHD). Após análise, as sequências comportamentais de corte e cópula foram descritas, e posteriormente ilustradas por um desenhista profissional.

Figura 6 - A) Adultos de *Opsiphanes invirae* alimentando-se com solução de melação a 15%; B) telado utilizado na condição de semi-campo para avaliação do comportamento sexual



Fonte: Autora, 2018.

LEGENDA

B) medidas do telado 1,80 x 3,0 x 2,3 m;

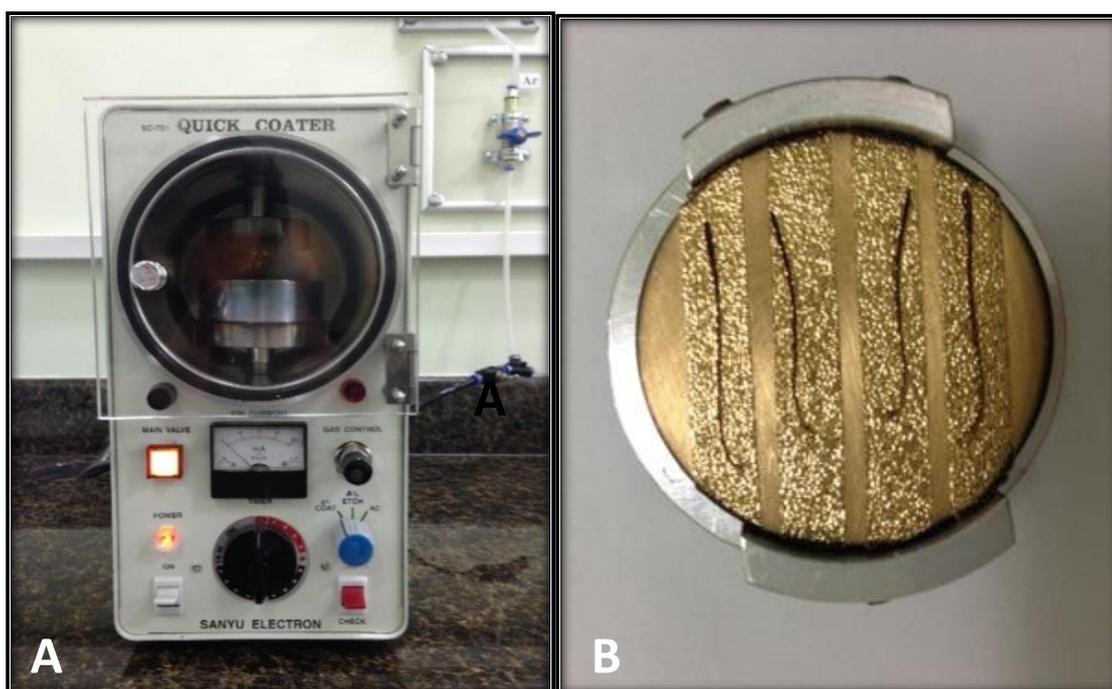
3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de antenas de *O. invirae*

As análises de MEV foram realizadas no Laboratório de Caracterização de Materiais do grupo de Óptica e Nanoscopia do Instituto de Física, da Universidade Federal de Alagoas, UFAL.

As antenas de machos e fêmeas virgens de *O. invirae* foram removidas com 24 horas de idade e imediatamente fixadas em solução de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato (0,1 M PH 7) por 20 min. Em seguida, as antenas passaram por uma desidratação gradual em solução de etanol a 70%, 80%, 90% e 100%, por cinco minutos cada, em banho de ultrassom.

Após desidratação, as antenas foram colocadas sob uma superfície de papel para retirada do excesso de etanol. A montagem das antenas para análise ocorreu em uma base de metal sobre fita adesiva elétrica de sulfato de carbono, recebendo em seguida, um banho metálico em metalizador Sanyuy Electron, modelo Quick Coater SC-701 (Figuras 7A e 7B). A corrente utilizada durante o processo de metalização com alvo de ouro foi de 10 mA durante 8 minutos. As imagens das antenas foram realizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura (SHIMADZU, modelo SSX-550 Superscan). No total foram utilizadas três antenas de cada sexo.

Figura 7 – A) Equipamento utilizado para metalização das antenas de *Opsiphanes invirae*; B) antenas metalizadas



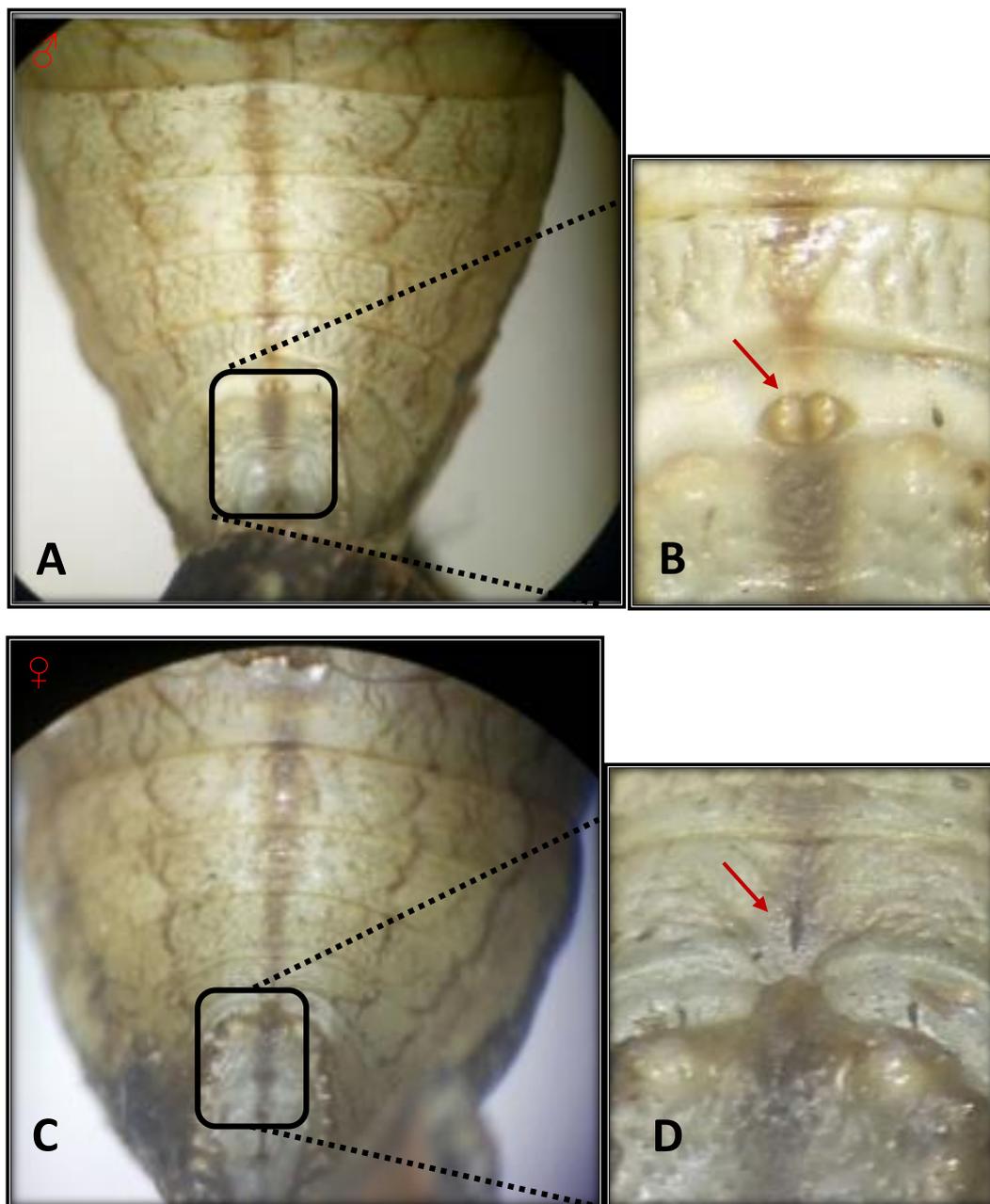
Fonte: Autora, 2018.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Dimorfismo sexual em *Opsiphanes invirae*

Os dados obtidos permitiram identificar dimorfismo sexual nas regiões do abdome e asas nas crisálidas e nos adultos. Nas crisálidas, uma das formas de verificar o dimorfismo é a presença de duas saliências no último segmento do abdome do macho (Figuras 8A e 8B), enquanto que na fêmea se constatou um sulco superficial no penúltimo segmento do abdome (Figuras 8C e 8D). Tais estruturas, somente são visíveis com o uso de lupa estereoscópica. A vantagem desta técnica é a possibilidade de verificar o dimorfismo a qualquer momento nesta fase de desenvolvimento.

Figura 8 - Dimorfismo sexual em crisálidas de *Opsiphanes invirae*



Fonte: Jakeline Santos, 2018.

LEGENDA: A) crisálida macho;

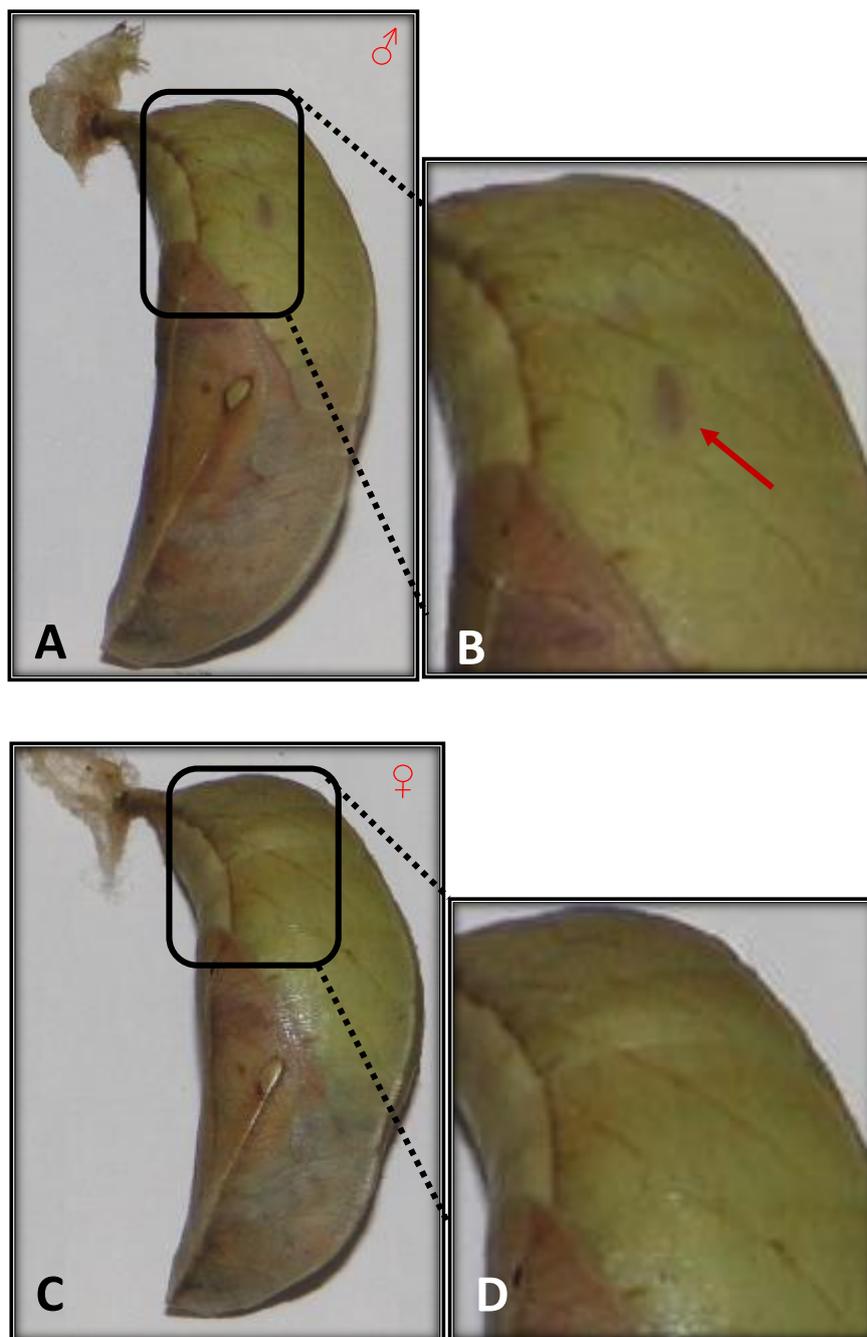
B) detalhe das duas saliências presentes no último segmento abdominal;

C) crisálida fêmea;

D) detalhe do sulco superficial localizado no penúltimo segmento abdominal

A outra forma de observar essa diferenciação é quando o inseto está prestes a emergir. É possível notar neste momento, uma macha na lateral das crisálidas macho (Figuras 9A e 9B), visível a olho nú, e ausente nas fêmeas (Figuras 9C e 9D).

Figura 9 - Dimorfismo sexual em crisálidas de *Opsiphanes invirae*

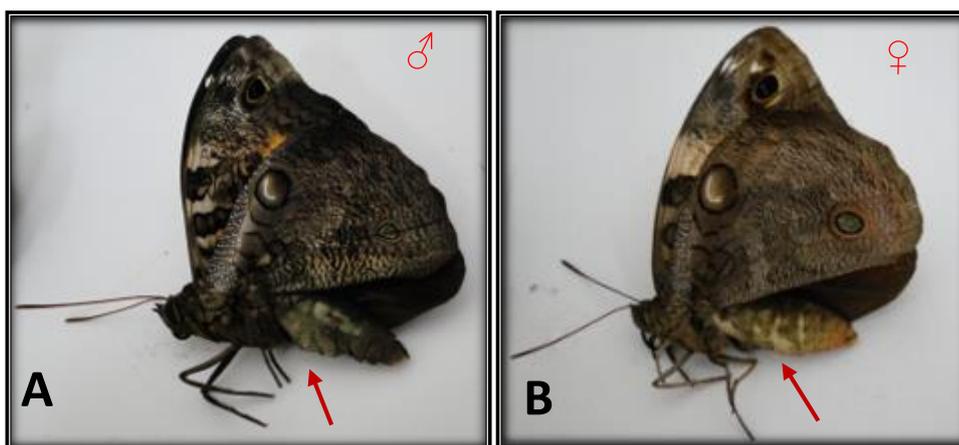


Fonte: Autora, 2018.
 LEGENDA: A) crisálida macho;
 B) detalhe da mancha visível;
 C) crisálida fêmea;
 D) detalhe sem mancha.

Nos adultos, verifica-se, no abdome do macho, a presença de uma estrutura delgada e esverdeada, na parte central da lateral do abdome, ausente na fêmea (Figuras 10A e 10B). No interior desta, observamos ainda, a presença de duas estruturas na cor marrom-alaranjada, localizadas no quarto e quinto segmento

abdominal, onde uma delas se apresenta alongada em tamanho maior, em referência a segunda, em tamanho bem menor. Portanto, pela posição do inseto na crisálida, constatou-se que a mancha visível, se trata da estrutura marrom-alaranjada presente no abdome do macho adulto, e ausente na fêmea adulta. A vantagem desta diferenciação nas crisálidas decorre da facilidade da identificação dos sexos a olho nú, e conseqüentemente, na agilidade na separação. No entanto, este dimorfismo somente é notado quando o inseto está próximo da emergência, limitando o momento da identificação nesta fase. Ainda sobre o abdome do adulto, é notável o tamanho maior do abdome da fêmea, apresentando-se mais robusto e de coloração amarelo alaranjada, enquanto o macho realça a cor preta na coloração, com um abdome menor e mais delgado (Figuras 10A e 10B).

Figura 10 - Dimorfismo sexual em adultos de *Opsiphanes invirae*



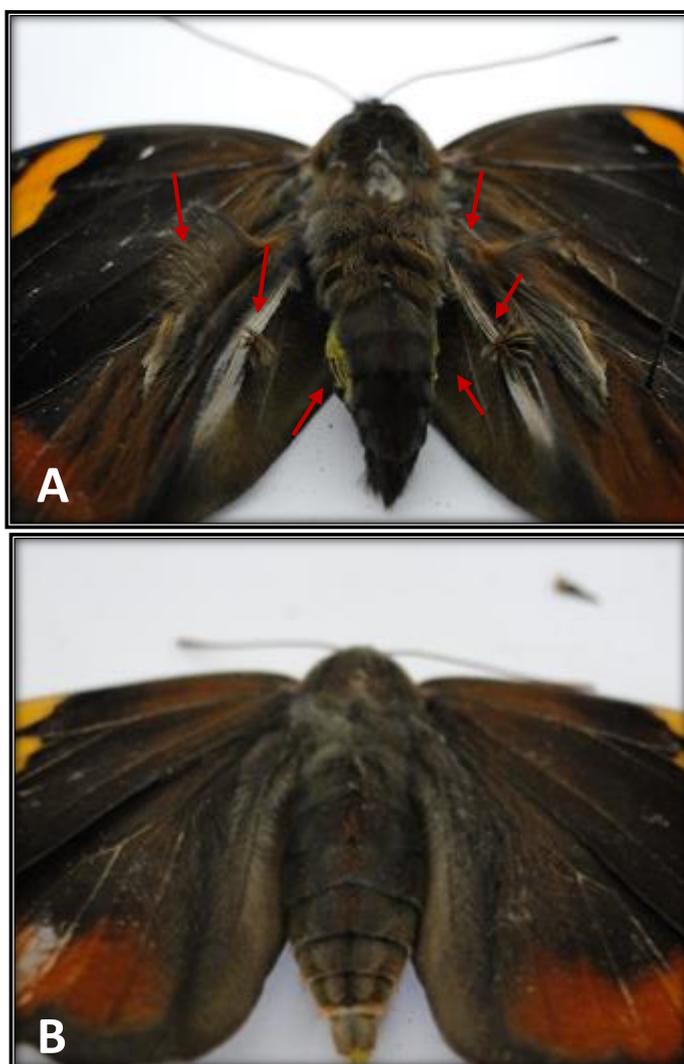
Fonte: Autora, 2018.

A) abdome do macho na cor preta e presença de uma estrutura delgada de cor verde nas laterais;

B) abdome da fêmea, mais robusto que o abdome do macho e na cor amarelo-alaranjado

No adulto de *O. invirae* além do abdome, se verificou um dimorfismo sexual nas asas posteriores do macho, ausente em fêmeas (Figuras 11A e 11B). O macho apresenta em suas asas posteriores tufo de pêlos, distinguindo-se da fêmea.

Figura 11 - Dimorfismo nas asas posteriores do adulto macho de *Opsiphanes invirae*



Fonte: Autora, 2018.

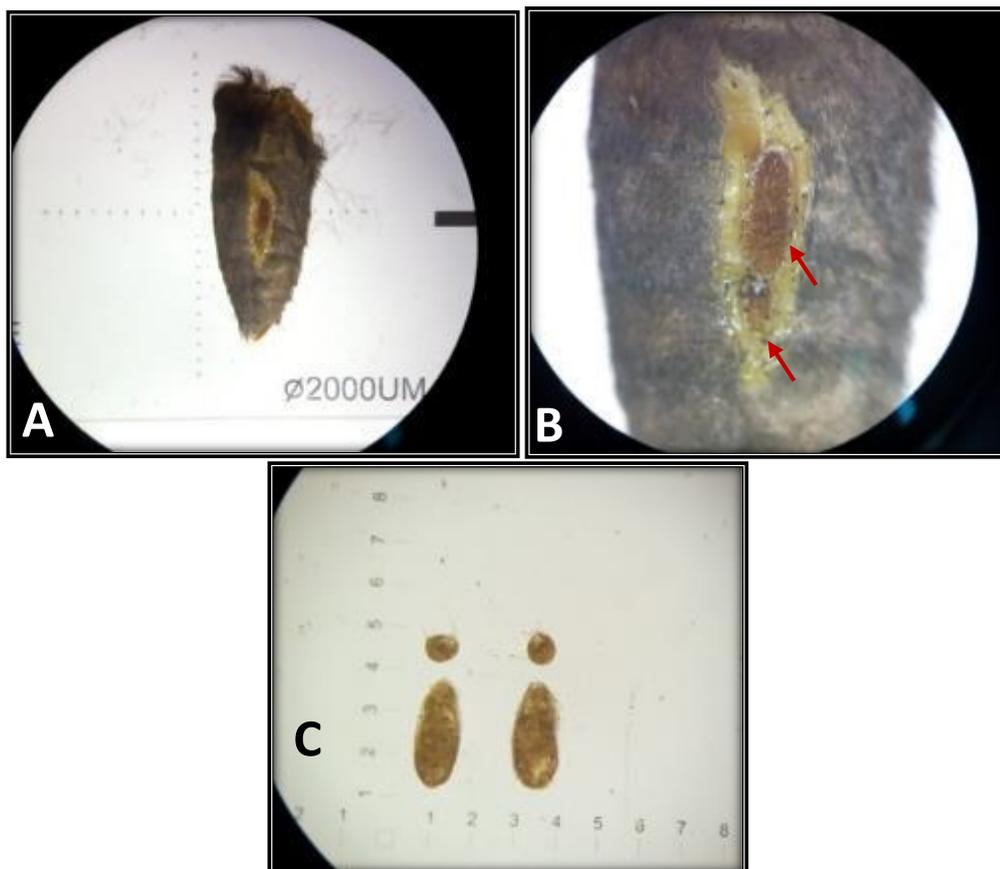
A) regiões odoríferas nas asas (região cinza-marrom e pincéis distribuidores) e mancha lateral no abdome do macho;

B) asas da fêmea com ausências de estruturas odoríferas

Em adultos de *O. invirae isagoras*, secreções das glândulas dos machos liberam um cheiro agradável perceptível ao olfato humano. Nos machos da referida espécie foi relatado a presença de três órgãos odoríferos: no primeiro, a presença de uma área glandular (AG) nas laterais do abdome (placas glandulares no quarto e quinto segmentos), e pincel distribuidor (PD) nas asas posteriores; no segundo, AG nas asas posteriores e PD ao lado da AG; e no terceiro, escamas odoríferas isoladas nos tergitos do abdome (BARTH, 1980).

Pressupomos que essas estruturas (cor marrom-alaranjada) presentes na lateral do abdome de *O. invirae*, sejam placas glandulares (AG) (Figuras 12A, 12B e 12C.).

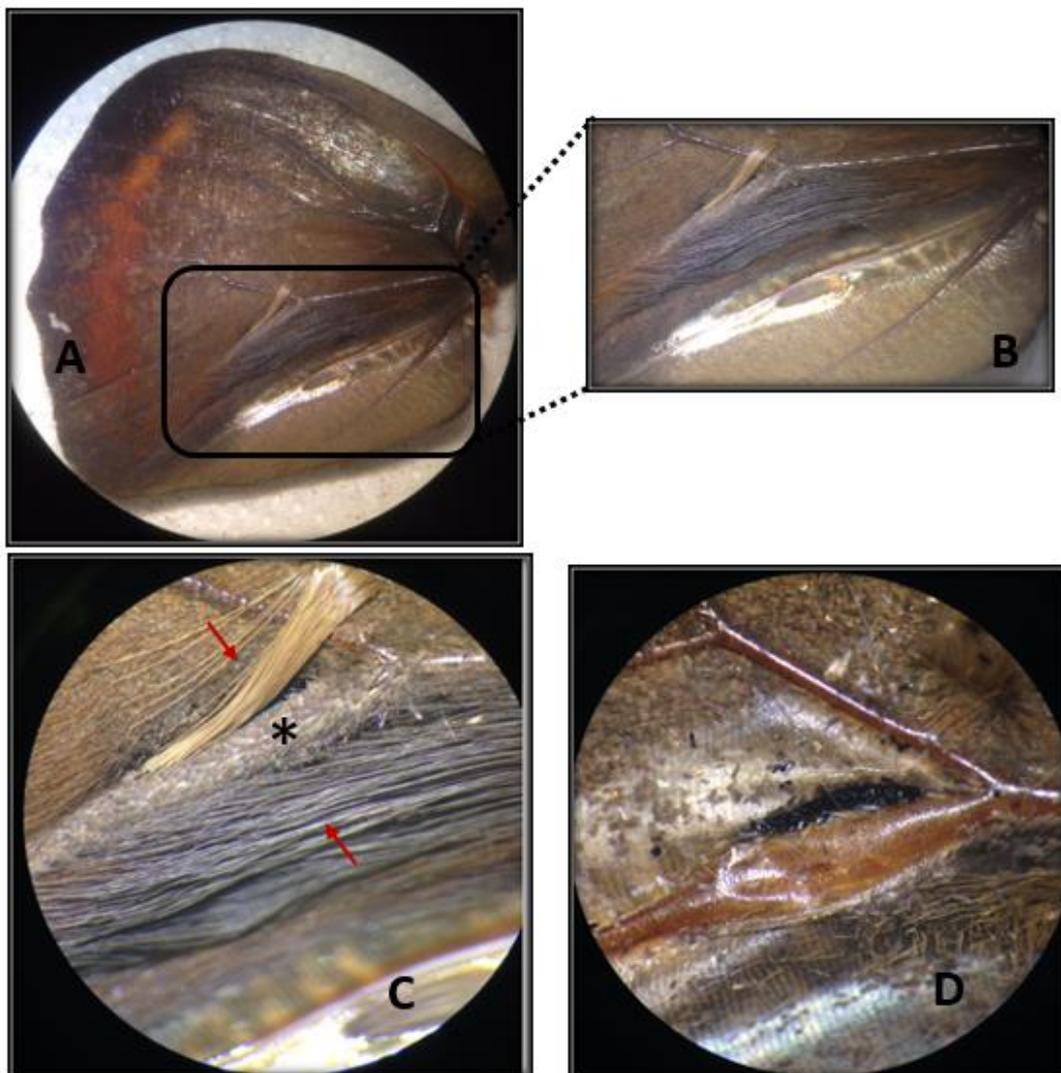
Figura 12 - A) Abdome do macho de *Opsiphanes invirae*; B) placas glandulares no quarto e quinto segmento abdominal; C) detalhe do tamanho das placas: com aproximadamente 4 mm de comprimento e 1 mm de largura



Fonte: Jakeline Santos, 2018.

Outra observação é a presença do pincel distribuidor nas asas posteriores entre as nervuras 3A e (1A + 2A) em uma região com uma mancha alar cinza-marrom (Figuras 13A e 13B). A dilatação presente na nervura Cu2 semelhante uma bolsa odorífera localizada na asa posterior e coberta por escamas, seria outra AG, estando associada a pincéis de pelos (um grande e outro pequeno) (Figuras 13C e 13D).

Figura 13 - A) Asa posterior do macho de *Opsiphanes invirae*, com presença de regiões odoríferas; B) detalhe da região odorífera brilhante na asa (cinza-marrom), associada a pincel pelo; C) detalhe da região com líquido odorífero abaixo das escamas, e entre os pincéis de pelos; D) imagem da dilatação com líquido odorífero (cor laranja), após retirada das escamas e pincéis de pelos para melhor visualização. (*) escamas; (seta) pincel de pelos



Fonte: Autora, 2018.

Estas regiões odoríferas presentes no abdome e asas do macho se caracterizam, como as estruturas androconiais de *O. invirae*. Por ocasião deste dimorfismo, realizamos análises químicas nas regiões androconiais relatadas acima. Vale ressaltar, que o odor agradável liberado no horário de comportamento reprodutivo desta espécie, perceptível ao nosso olfato, é o mesmo presente no abdome e asas posteriores do macho, ausente em fêmeas. Na análise das asas, após este comportamento, verificamos a presença de um líquido na cor amarela nas

regiões da mancha alar (cinza-marrom) e bolsa odorífera, onde os pincéis presentes nestes órgãos (pincéis distribuidores) se abrem em função de certos movimentos e posições do corpo do macho, indicando serem os responsáveis pela liberação do odor. Estas observações morfológicas evidenciam, assim, a presença de estruturas envolvidas na liberação do feromônio pelo macho de *O. invirae*.

3.3.2 Análise do comportamento sexual de *Opsiphanes invirae*

A partir das observações em campo, foi determinado que o comportamento sexual de *O. invirae* ocorre no horário crepuscular entre 18:00 e 18:30 hrs. Dessa forma, durante este período os comportamentos de corte, pré-cópula e cópula foram observados e descritos em condições de semi-campo (telado).

3.3.2.1 Corte

O cortejo das fêmeas (Figura 14) inicia-se com movimentos agitados, enquanto os machos permanecem parados. Fêmeas andam no telado em movimento de caminhamento, e por vezes, sem se deslocar, realiza giros (movimento de rotação) em vários graus, e sentidos. Realizam movimentos de caminhar batendo asas de forma agitada, na sequência realizam vôos. Quando paradas, vibram e batem as asas, realizando também o movimento de levantar e abaixar continuamente as asas anteriores. Voam em vários sentidos, tocando em outras fêmeas, para em seguida uma grande agitação.

Na caracterização do cortejo dos machos (Figuras 14), estes vibram a antena e as asas, e por consequência, todo o corpo. Caminham, batem e pressionam as asas. Realizam pequenas aberturas nas asas, ao mesmo tempo em que as vibram. Estes movimentos precedem uma grande agitação, em vôo, dos machos, e na sequência, fêmeas e machos voam juntos (poucos minutos). Os machos voam de forma agitada em conjunto com outros machos e liberam o feromônio.

A quantidade de feromônio liberado chega a ser perceptível aos humanos, possuindo um aroma agradável (cheiro semelhante ao de baunilha). A liberação do feromônio realizado pelos machos estimulam as fêmeas ao pouso, ficando receptivas ao macho (Figuras 15A e 15B).

Figura 14 - Corte da fêmea e do macho de *Opsiphanes invirae*

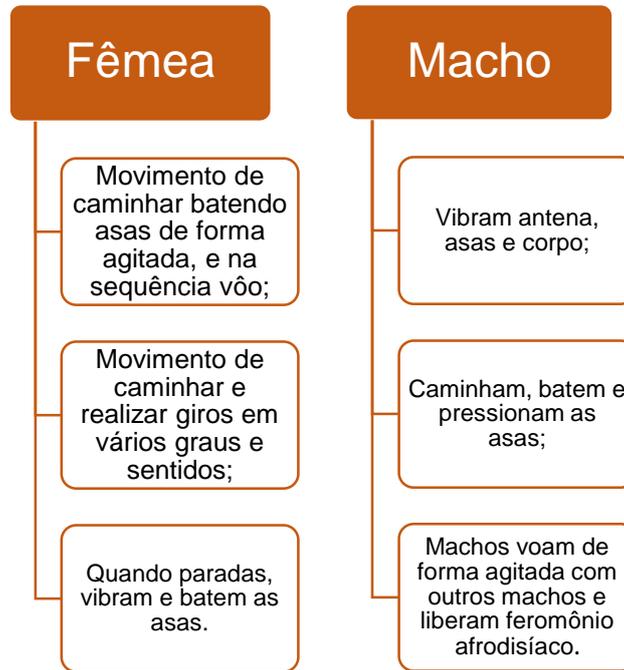


Figura 15 - Corte do macho de *Opsiphanes invirae*: A) macho toca asa da fêmea com as antenas; B) macho se posiciona ao lado da fêmea, expõe abdome para iniciar tentativa de tocar a genitália da fêmea



Fonte: Autora, 2018.

B) Seta vermelha: exposição do abdome do macho.

3.3.2.2 Pré-cópula e cópula

Após liberação do feromônio sexual ou afrodisíaco pelos machos para estímulo da fêmea à cópula, sete etapas foram observadas, resultando em um acasalamento exitoso (Figura 16). Primeiro, o macho localiza a fêmea. Esta pode estar parada e o macho voa em sua direção. Por vezes, a fêmea se encontra em vôo, e o macho realiza uma perseguição aérea até o pouso da fêmea. Segundo, o macho aproxima-se da fêmea que está em pouso, e ainda em vôo, bate asas agitadamente, na tentativa de melhor se posicionar, e realiza a corte tocando as asas da fêmea com suas antenas. Terceiro, o macho se posiciona lateralmente ou perpendicularmente à fêmea, em contínuo movimento de bater as asas agitadamente (condição de sustentação em vôo), e curva seu abdome freneticamente na tentativa de tocar a porção final do abdome da fêmea, realizando a tentativa de cópula. Quarto, quando a fêmea está receptiva, a mesma realiza o movimento de levantar as asas, deixando exposta sua região abdominal, e indicando aceitação do parceiro para realização da cópula. Quinto, o comportamento da fêmea de levantar as asas é entendido pelo macho, e este rapidamente realiza o acoplamento das genitálias (Figura 17 A e 17B). Sexto, após o acoplamento, o macho gira seu corpo em 180°, e fica em direção contrária ao corpo da fêmea, mas no mesmo sentido vetorial. Sétimo, após a fêmea fechar suas asas, a cópula se inicia.

Figura 16 – Etograma da sequência comportamental de pré-cópula e cópula de *O. invirae*

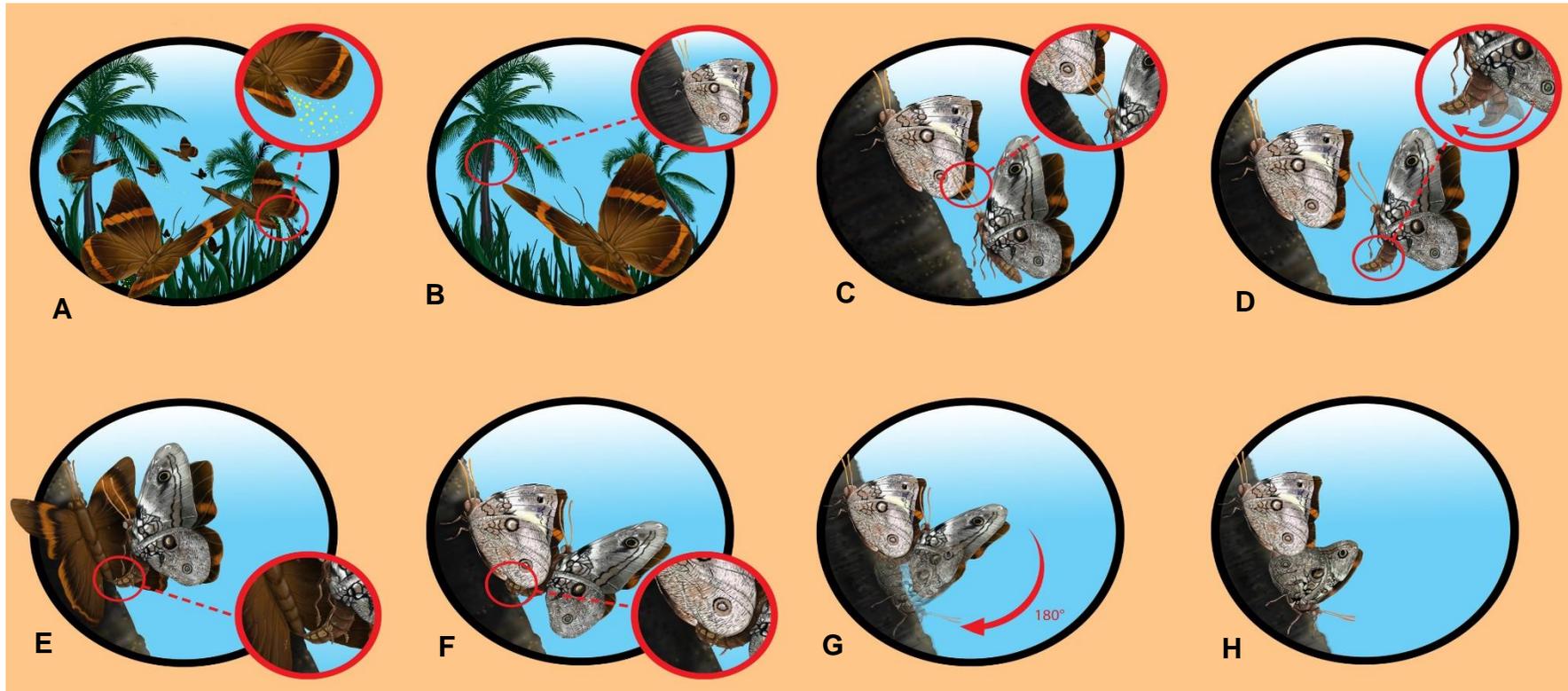
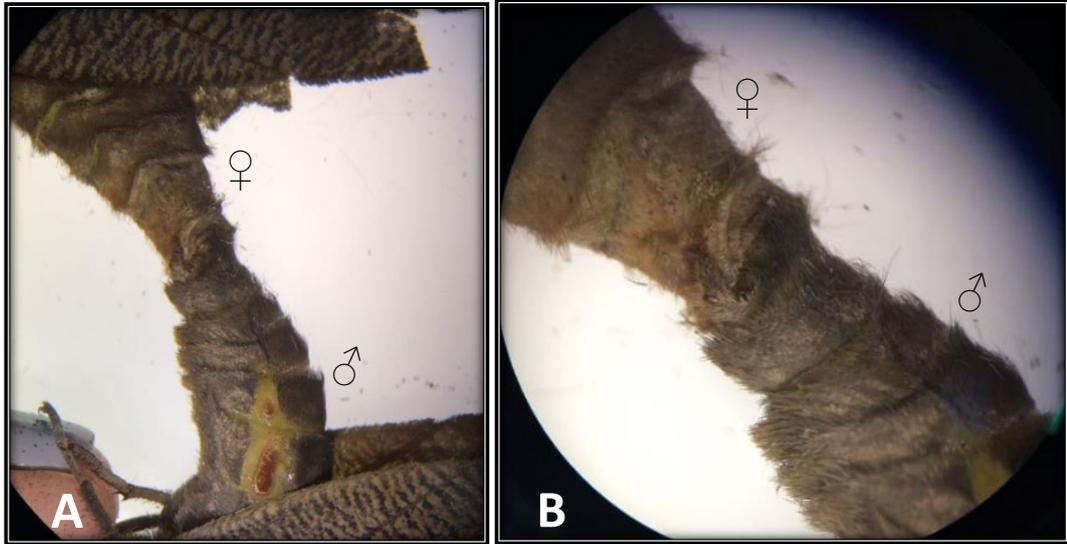


Ilustração: Chris Nazza, 2018.

LEGENDA:

- (A) Os machos liberam o feromônio sexual ou afrodisíaco para estímulo da fêmea à cópula; (B) o macho localiza a fêmea, e voa em sua direção; (C) macho aproxima-se da fêmea ainda em voo, batendo as asas agitadamente e toca as asas da fêmea com suas antenas; (D) macho se posiciona lateralmente ou perpendicularmente à fêmea, em condição de sustentação em voo, e curva seu abdome freneticamente na tentativa de tocar a porção final do abdome da fêmea. (E) fêmea levanta as asas indicando aceitação do parceiro; (F) ocorre o acoplamento das genitálias; (G) após o acoplamento, o macho gira seu corpo em 180°, e fica em direção contrária ao corpo da fêmea; (H) inicia-se, a cópula.

Figura 17 – A e B) Acoplamento das genitálias de macho e fêmea de *Opsiphanes invirae* durante a cópula



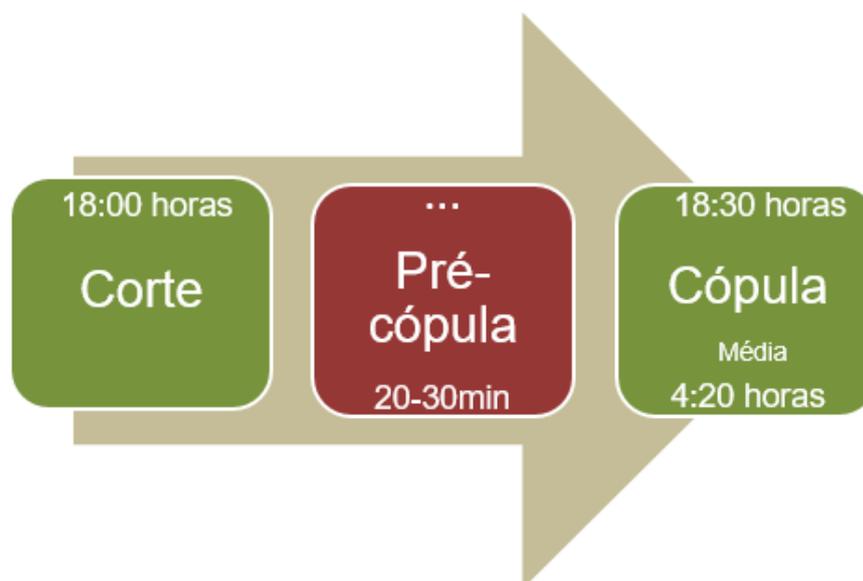
Fonte: Autora, 2018.

3.3.2.3 Pós-cópula

Ao término da cópula, os insetos desacoplam as genitálias e ficam parados no sentido inverso, lado a lado. Sempre bem próximos, raramente há vôo, ou distanciamento.

A duração da pré-cópula de *O. invirae* foi observada em 20 indivíduos de *O. invirae*, ocorrendo em média entre 20 a 30 min. Quando ocorre o acasalamento, a média da cópula dura cerca 4h e 20min., sendo a mínima de 3h e a máxima de 7h e 30min. Machos e fêmeas ficam maduros sexualmente apenas no segundo dia de vida (Figura 18).

Figura 18 – Fluxograma do comportamento reprodutivo de *Opsiphanes invirae*.



LEGENDA:

Início do comportamento reprodutivo (corte): 18:00 horas;

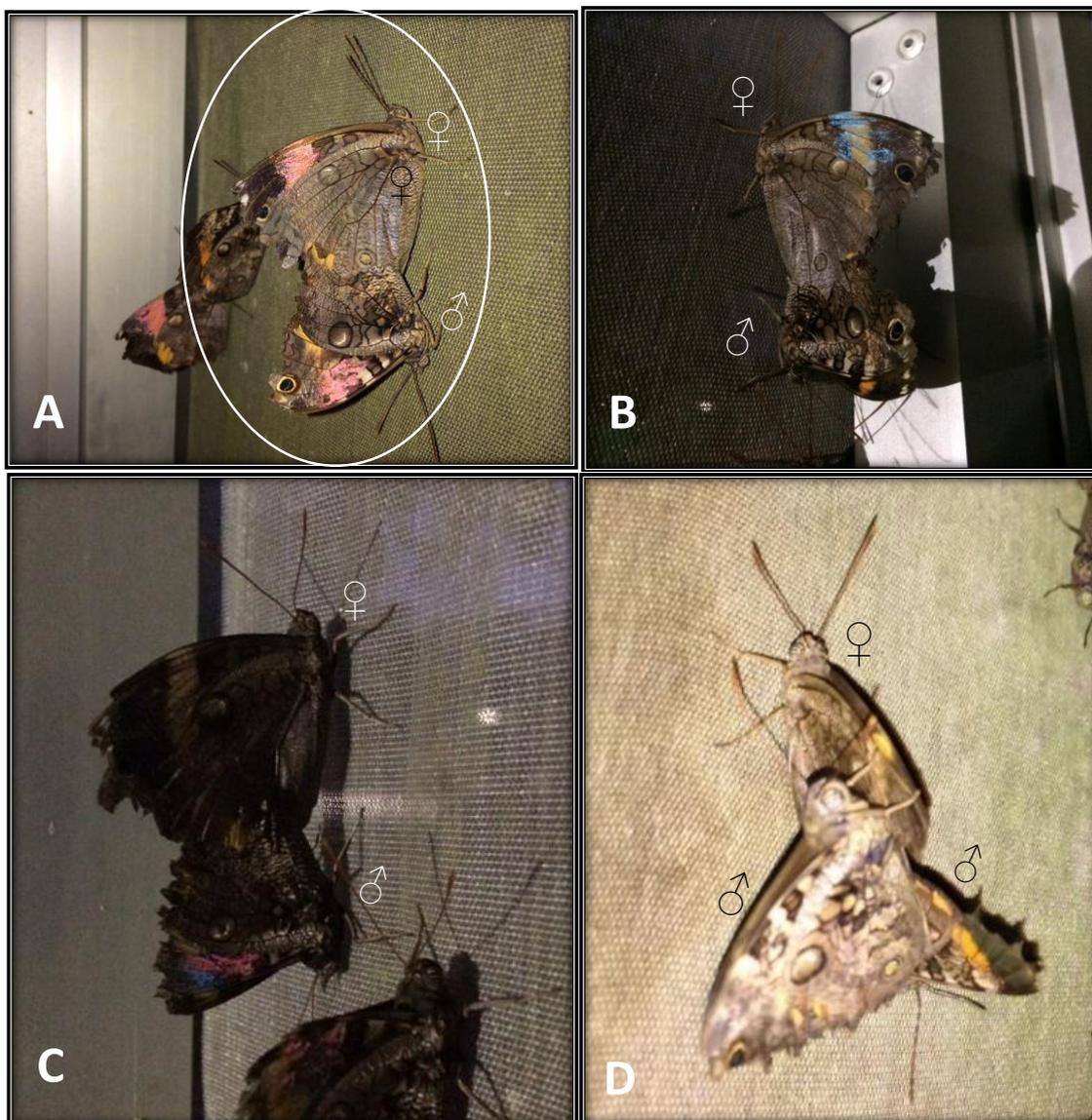
Duração da pré-cópula: 20 -30 min;

Término do comportamento reprodutivo: 18:30 horas;

Duração da cópula: média de 4:20 horas.

Em todas as observações não foi verificado cópula no primeiro dia de vida. Observamos que machos e fêmeas acasalam mais de uma vez, inclusive com indivíduos já acasalados (Figura 19A). Registramos em dias consecutivos, duas cópulas realizadas por duas fêmeas (Figura 19B), e até três cópulas realizadas por um macho (Figura 19C). Também foi observado, machos tentando copular com fêmeas em acasalamento (Figura 19D). Para saber quando se tratava da primeira, segunda ou terceira cópula do mesmo espécime, estes foram marcados nas asas com um pincel específico de cores vermelho, azul e verde: uma cópula (marcada com uma cor); duas cópulas (marcada com duas cores) e três cópulas (marcada com três cores).

Figura 19 - Cópulas de *Opsiphanes invirae*



Fonte: Autora, 2018.

LEGENDA:

- A) macho e fêmea acasalando pela segunda vez com parceiros que já copularam;
- B) fêmea acasalando pela segunda vez com macho virgem;
- C) macho acasalando pela terceira vez com uma fêmea virgem;
- D) macho tentando cópula com fêmea que já se encontra copulando.

No decorrer das coletas de pupas era realizada a sexagem, observando que os machos emergem antes das fêmeas, e que a longevidade dos adultos dura de 6 a 10 dias. A emergência dos insetos ocorre no horário matutino, com maior frequência entre 7:00 e 9:30 h, podendo se estender até o fim da manhã. A oviposição das fêmeas foi observada durante o dia, com maior frequência no horário vespertino, cessando por volta das 17:30h. A postura dos ovos era realizada de forma individualizada ou gregária, (Figuras 20A e 20B).

Figura 20 - A e B) Fêmea de *Opsiphanes invirae* ovipositando; B) Ovos no pecíolo de folha de coqueiro



Fonte: Autora, 2018.

No acasalamento, ambos os sexos apresentaram seqüências de comportamento de corte. Em borboletas, o namoro é um ritual complexo, que envolve a troca de estímulos visuais, químicos e táteis (ANDERSSON et al., 2007; SILBERGLIED, 1984). Nestes insetos, a localização do parceiro é efetuada por meio de adaptações comportamentais de ambos os sexos e da busca visual de longo alcance pelos machos (VANE-WRIGHT; BOPPRE, 1993). Ao contrário das mariposas, fêmeas de borboletas são desprovidas de glândulas de feromônio sexuais em seus ovipositores e, portanto, não liberam feromônio de longo alcance para atração dos machos (MONTEYS et al., 2016).

Em geral, a corte em borboletas é iniciada pelos machos, quando estes localizam as fêmeas fazendo uso de um ou dois padrões de comportamento: ou esperam por fêmeas em locais onde estas podem ser encontradas, ou fazem a busca destas. Além das cores e formas, os machos das borboletas são fortemente atraídos por movimentos, sendo este último um importante componente de atração inicial (SILBERGLIED, 1984). Se os machos são atraídos por movimentos gerados por fêmeas receptivas, estes apresentam um maior comportamento de corte, realizando interações aéreas coespecíficas mais intensas (MYERS, 1972). Estes eventos podem explicar o comportamento inicial de corte observado em *O. invirae*, onde, primeiramente ocorre a movimentação das fêmeas realizando movimentos de caminhar batendo asas de forma agitada, na seqüência realizam vôos. Quando paradas, vibram e batem as asas, realizando também o movimento de levantar e abaixar continuamente a asa anterior, dentre outros movimentos descritos

anteriormente, para somente na sequência, os machos iniciarem movimentação e interação entre machos e fêmeas.

Ao lado dos sinais químicos, os sinais visuais e táteis exercem importante papel no estágio inicial de corte (VANE-WRIGHT; BOPPRE, 1993; WYATT, 2009). Em nosso estudo, machos tocam as fêmeas durante a corte. Esse comportamento também foi revelado em *Bicyclus anynana* Butler (Lepidoptera: Nymphalidae) (NIEBERDING et al., 2008). Em *B. anynana*, os sinais visuais se mostraram importantes para o reconhecimento de machos coespecíficos a longa distância, no entanto, o reconhecimento a curto alcance se mostrou mais relevante (VANE-WRIGHT; BOPPRE, 1993).

Durante a corte dos machos foi observado uma interação coespecífica, e a posterior liberação do feromônio para estímulo das fêmeas. Esse comportamento de interação aérea por machos é realizado por muitas espécies de borboletas com objetivo de acasalamento (KEMP; WIKLUND, 2001; TAKEUCHI, 2017; ROSENBERG; ENQUIST, 1991). Machos de borboletas da subfamília Ithomiinae, por exemplo, possuem grande capacidade de agregação, realizando exibições aéreas de corte (HABER, 1978; PINHEIRO et al., 2008).

O efeito da disseminação do feromônio afrodisíaco de machos sobre as fêmeas foi evidenciado em diversas espécies. O primeiro feromônio afrodisíaco identificado em borboletas ocorreu em *Danaus gilippus* (Cramer, 1775) (Lepidoptera: Nymphalidae), liberado pelo “hairpencil” dos machos (MYERS; BROWER, 1969; MEINWALD et al., 1969). O papel quimioestimulante do “hairpencil” no comportamento de corte da referida espécie revelou significativa redução no sucesso da cópula quando da remoção do hairpencil ou bloqueio dos quimiorreceptores nas antenas das fêmeas (MYERS; BROWER, 1969).

Os resultados do estudo com *Ideia leuconoe* Erichson, 1834 (Lepidoptera: Nymphalidae) evidenciaram a atração das fêmeas pelos extratos do hairpencil dos machos utilizando um modelo de borboleta artificial (NISHIDA et al., 1996). Em *Pieris napi* (L., 1758) (Lepidoptera: Pieridae), o efeito do feromônio afrodisíaco dos machos para aceitação da fêmea também foi evidenciado, ocorrendo um aumento na aceitação da fêmea quando se aumentou a concentração do componente feromônico. Quando diminuiu essa concentração, reduziu-se a aceitação das fêmeas (ANDERSSON; VONGVANICH; WIKLUND, 2007). Em recente estudo, Darragh e colaboradores (2017), demonstraram a importância da sinalização

química para a escolha do parceiro em borboletas *Heliconius melpomene* (L., 1758) (Lepidoptera: Nymphalidae). As fêmeas dessa espécie demonstravam uma escolha entre dois machos, dos quais apenas um possuía o bloqueio das estruturas liberadoras de feromônio na região das asas. O resultado foi que fêmeas só acasalaram com os machos que possuíam a integridade de suas asas contendo as estruturas feromonais.

Durante a corte de *O. invirae* as secreções emitidas pelos machos, foram perceptíveis ao nosso olfato. Em muitas espécies de borboletas, os machos emitem aromas que são perceptíveis aos humanos (ANDERSSON et al., 2007). Este fato também foi observado nas secreções emitidas por machos de *O. invirae isagoras* Fruhstorfer, 1907 (Lepidoptera: Nymphalidae), liberando um cheiro agradável como baunilha (RUDOLF BARTH, 1980). Myers (1972) afirma, que embora as secreções de feromônios por borboletas tenham odores que sejam perceptíveis ao olfato humano, o composto ativo desses voláteis é inodoro para os humanos. Para Barth (1980), as secreções emitidas pelos machos destes lepidópteros são provenientes de glândulas estimulantes, favorecendo o sexo oposto a não fugir da cópula.

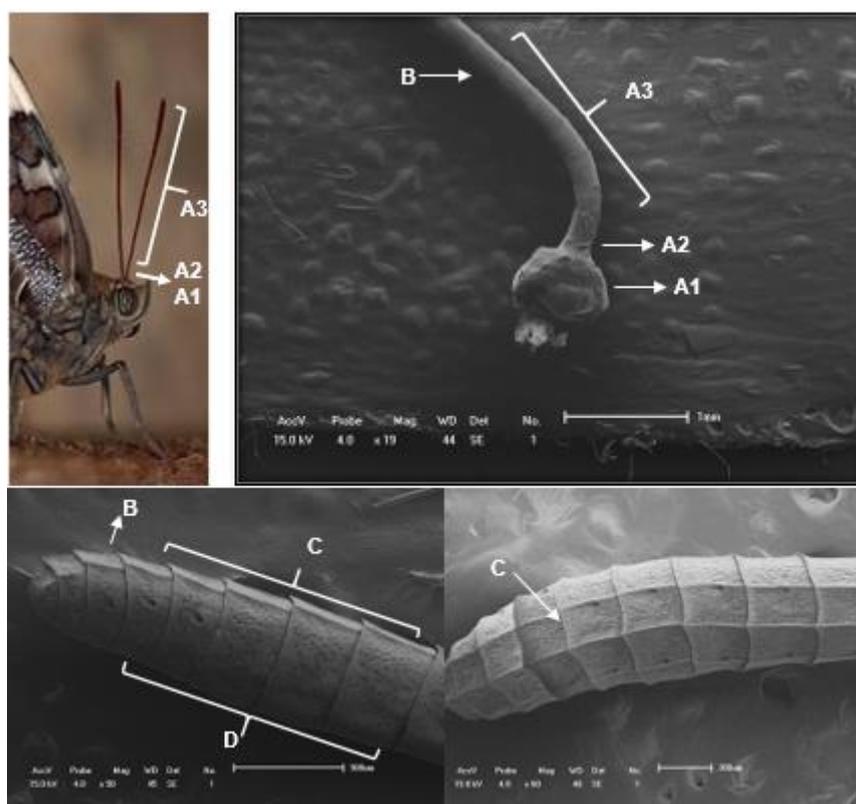
Neste trabalho, observamos que um quantitativo maior de machos de *O. invirae* emergiram antes das fêmeas. Em *Opisina arenosella* Walker (Lepidoptera: Oecophoridae), a emergência dos machos ocorre de três a sete dias antes das fêmeas (KUMARA et al., 2015). Na referida espécie, o padrão de atividade de campo monitorado por armadilhas, mostrou que o período de pico de atividade para os machos foi mais precoce do que o das fêmeas, uma tendência similar a do padrão de emergência (MURALIMOHAN; SRINIVASA, 2010). A precocidade da emergência de machos é um comportamento adaptativo e minimiza a morte pré-reprodutiva de fêmeas (FAGERSTROM; WIKLUND, 1982). Este fenômeno é conhecido como protandria, onde os machos estão reprodutivamente prontos antes das fêmeas (ZONNEVELD, 1992). A emergência dos machos antes da fêmea está relacionada a um maior sucesso reprodutivo, e é comum sua ocorrência em lepidópteros.

3.3.3 Morfologia das antenas de *Opsiphanes invirae*

As antenas de *O. invirae*, bem como em qualquer outro inseto, são subdivididas em três partes principais: escapo, pedicelo e flagelo. O escapo e o

pedicelo são as regiões menores associadas à base da antena, o flagelo é a região longa, que está dividida em antenômeros ou flagelômeros. A superfície dorsal e lateral do flagelo é composta por sensilas e, a ventral coberta por escamas (Figura 21). O tamanho médio da antena do macho é de 19,6mm e da fêmea 18,6 mm.

Figura 21 - Regiões da antena de *Opsiphanes invirae*



LEGENDA:
 A1-escapo;
 A2-pedicelo;
 A3-flagelo;
 B-flagelômero ou antenômero;
 C-região dorsal da antena;
 D- região ventral da antena.

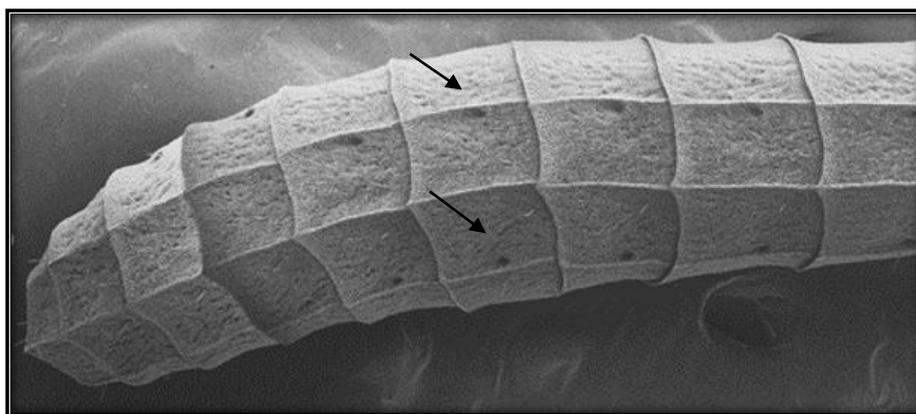
Foi identificado seis tipos de sensilas em machos e fêmeas de *O. invirae*: sensila tricoide, caética, coleocônica, esquamiforme, auricílca e Bohm. Ambos os sexos possuem de 37 a 44 segmentos (flagelômeros). As sensilas de *O. invirae* apresentaram-se morfologicamente semelhantes às relatadas nas espécies dos ninfalídeos *Euphydryas editha* (Boisduval, 1852); *Polygonia c-album* (L., 1758); *Aglais urticae* (L., 1758); e *Danaus gilippus berenice* (Cramer, 1776) e dos hesperiídeos *Parnara guttata* (Bremer & Grey, 1853); *Parnara bada* (Moore, 1878); *Pelopidas mathias* (Fabricius, 1798) e *Pelopidas agna* (Moore, 1866), sendo as

espécies do gênero *Parnara* e *Pelopidas* importantes pragas desfolhadoras na China (MYERS; BROWER, 1969; ODENDAAL et al., 1985; CARLSSON et al., 2013; XIANGQUN et al., 2014).

Outra característica comum entre *O. invirae* e os ninfalídeos citados acima é a presença de três cristas longitudinais separando dois sulcos, desde a base até o ápice da antena (Figura 9) (CARLSSON et al., 2013; ODENDAAL et al., 1985;).

Regiões afundadas na superfície da antena, semelhante a orifícios (P), foram observados na região da lateral e dorsal, mas sua função não é conhecida (Figura 22).

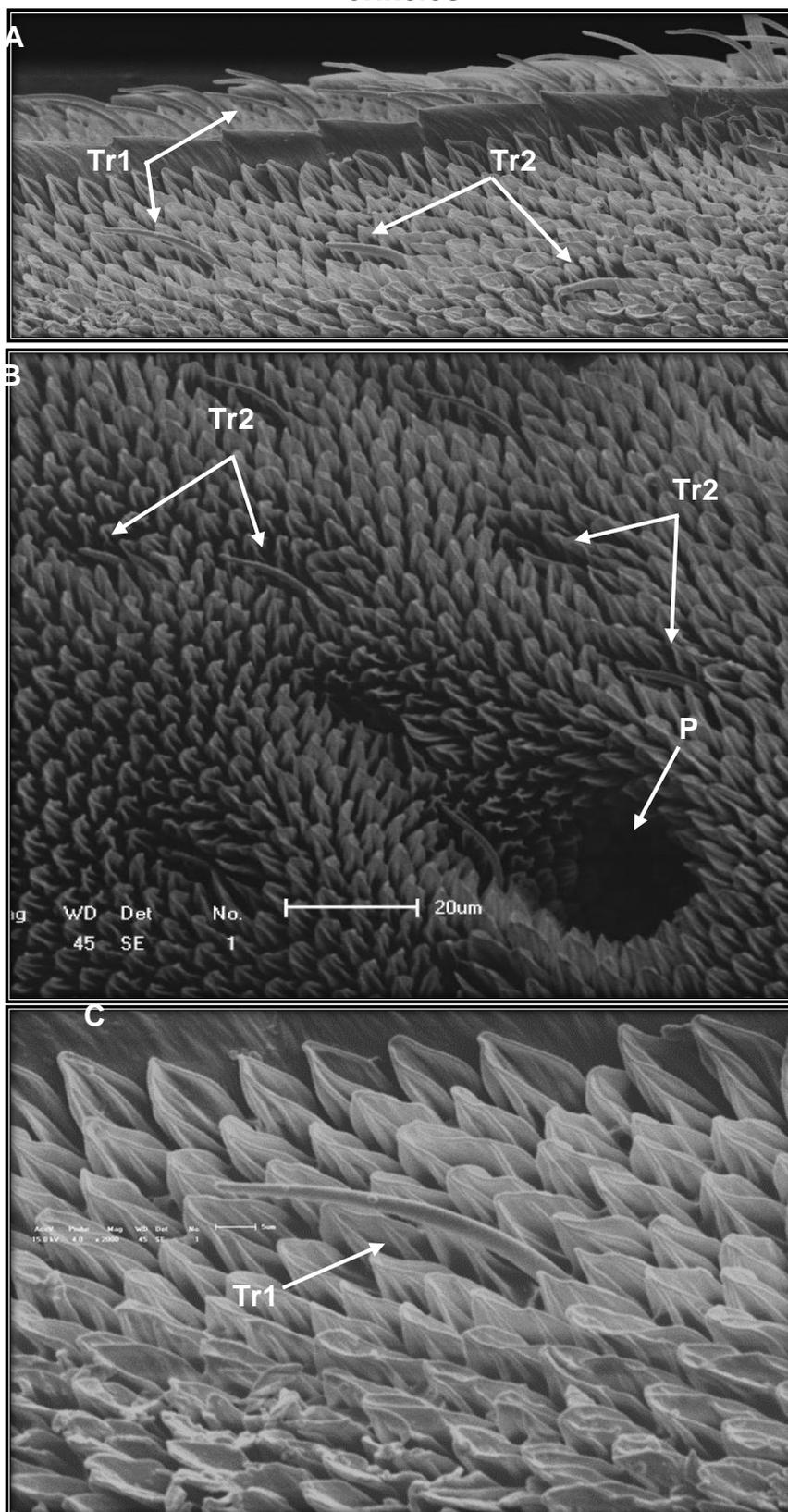
Figura 22 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das antenas de machos de *Opsiphanes invirae*: vista dorsal da antena caracterizada por três cristas longitudinais separando dois sulcos



P = presença de orifícios.

Sensilas tricoides (Tr1 e Tr2) são semelhantes a um cabelo, afilando-se apicalmente. Observamos dois tipos de sensilas tricoides, que foram diferenciadas pelo seu comprimento (Figura 23). São as mais abundantes na antena, mas precisamente, nos dois sulcos presentes na região dorsal, apresentando-se curvadas em direção à região distal da antena. Sua distribuição ocorre nos antenômeros mediais, diminuindo a frequência em direção à base e ápice, observando os orifícios distribuídos ao longo da antena.

Figura 23 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das antenas fêmeas (A, B e C) de *Opsiphanes invirae*. Tr1 e Tr2 = sensilas tricoides; P = presença de orifícios

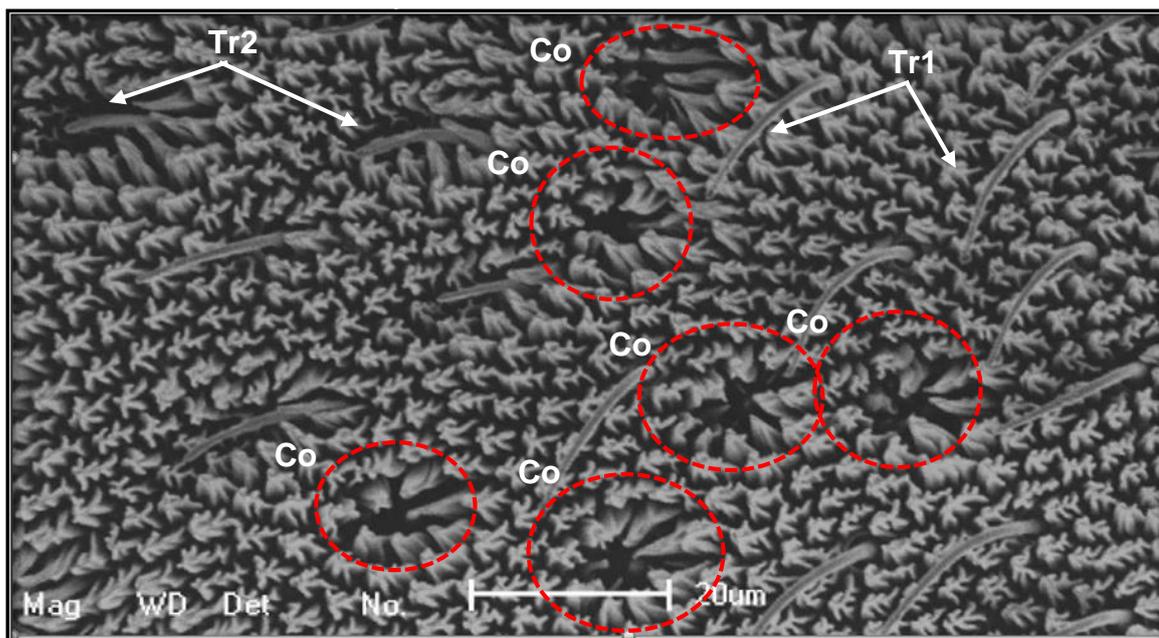


LEGENDA: A- aumento 700 x; B- aumento 600x; C- 2.000 x.

Com função olfativa, estes tipos de sensilas são multiporosas e estão envolvidas na detecção de feromônios sexuais (HANSSON, 1995). Para Myers e Brower (1969), as sensilas curtas e de paredes finas presentes em *D. gilippus bermice*, aqui indentificadas como Tr2, são as responsáveis pelo receptor de feromônio de machos. A função das sensilas de cerdas longas e paredes espessas em Danaine foram descritas por Myers em 1968 como mecanoreceptoras e prováveis quimiorreceptoras. Em 1972b, o referido autor afirma que essas estruturas nas antenas de machos e fêmeas de quatro espécies de borboletas da subfamília Danaine são os receptores de feromônios.

Sensilas coleocônicas (Co) são curtas, retas, e estão localizadas entre um anel de escamas (Figura 24). Estas apresentaram maior quantidade nas laterais dos sulcos e ápice da antena. Assim como as tricoides, apresentam grande densidade, e estão localizadas nos antenômeros centrais, diminuindo o número em direção às extremidades da antena. Usualmente, as sensilas coleocônicas estão associadas à função olfativa ou à dupla função de termorecepção olfativa (LIU et al., 2014; RUSCHIONI et al., 2015), e envolvidas na recepção de odores para locais de oviposição (POPHOF, 1997).

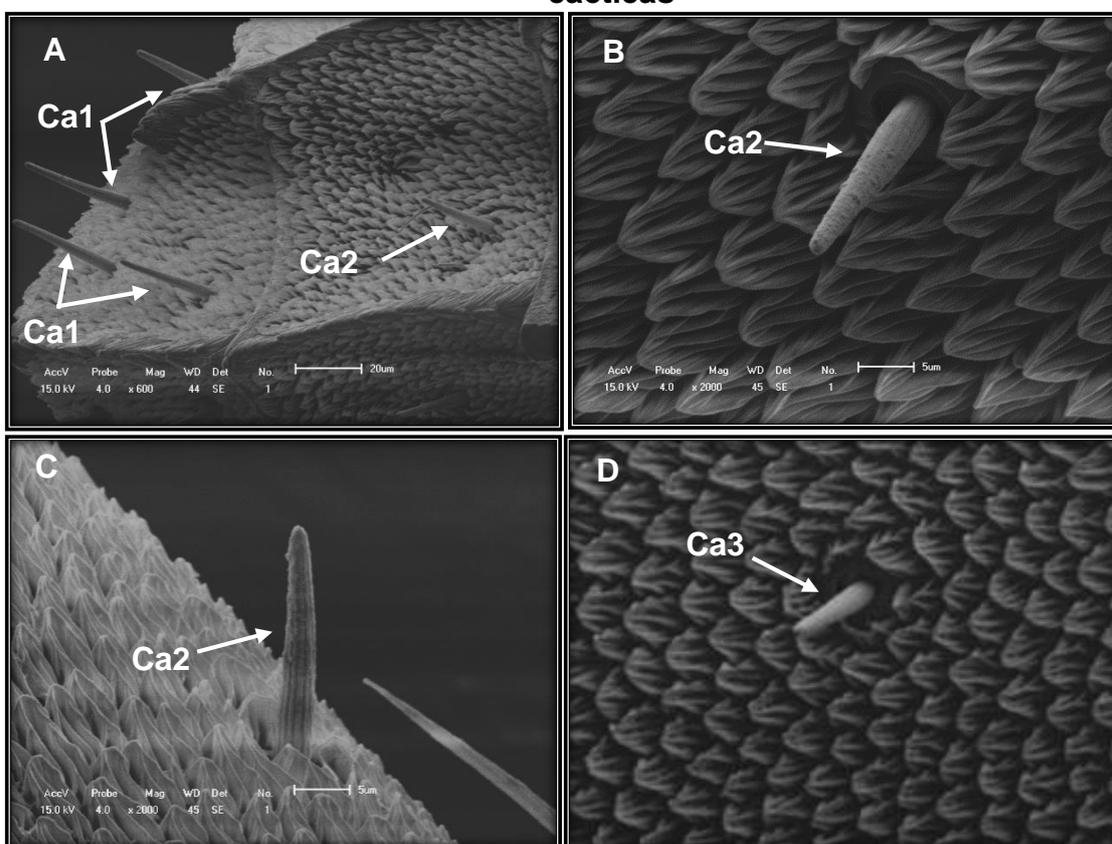
Figura 24 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das antenas de fêmeas de *Opsiphanes invirae*. Co-sensilas coleocônicas; Tr1 e Tr2 - sensilas tricoides



A-aumento 600 x;

Sensilas caéticas (Ca) são retas e de tamanhos variáveis, largas na base, afiadas na extremidade distal, e com sulcos ao longo de sua superfície. Em ambos os sexos foram observados três tipos de sensilas, diferenciadas pelo seu comprimento (Figura 25). Apresentam-se concentradas principalmente na extremidade basal de cada antenômero e no ápice da antena. Na literatura, sensilas caéticas estão relacionadas a funções mecanoreceptoras (RUSCHIONI et al., 2015), quimiorreceptoras de contato (HALBERG et al., 1994) e função gustativa (LIU et al., 2014).

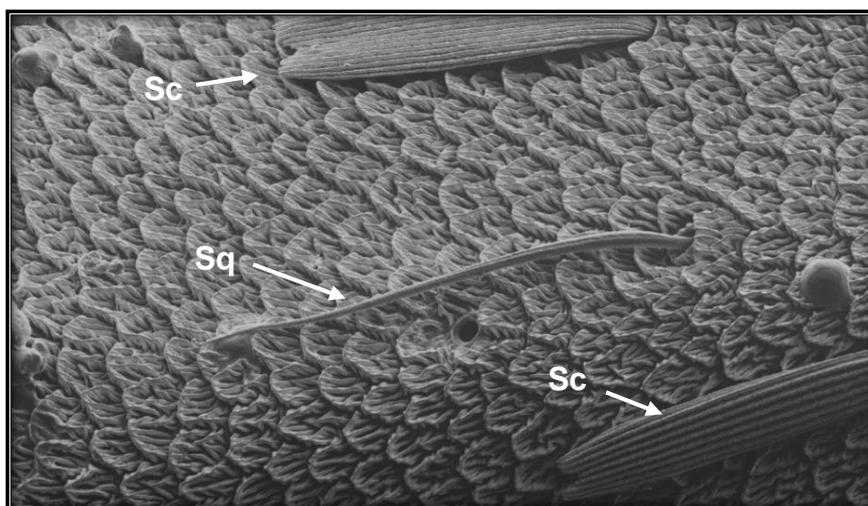
Figura 25 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das antenas de machos (A) e fêmeas (B, C e D) de *Opsiphanes invirae*. Ca1, Ca2 e Ca3 - sensilas caéticas



LEGENDA: **A**-aumento 600 x; **B** – aumento 2000 x; **C**- aumento 2.000 x; **D**- aumento 600x

As sensilas esquamiformes (Sq) são semelhantes a uma escama, alongada, plana, com sulcos em sua superfície, e afunilada na extremidade distal (Fig.26). Estão presentes, em baixa quantidade, nos antenômeros mais basais da antena. Para YAN et al. (2017) estas podem estar associadas à detecção de odores de plantas hospedeiras.

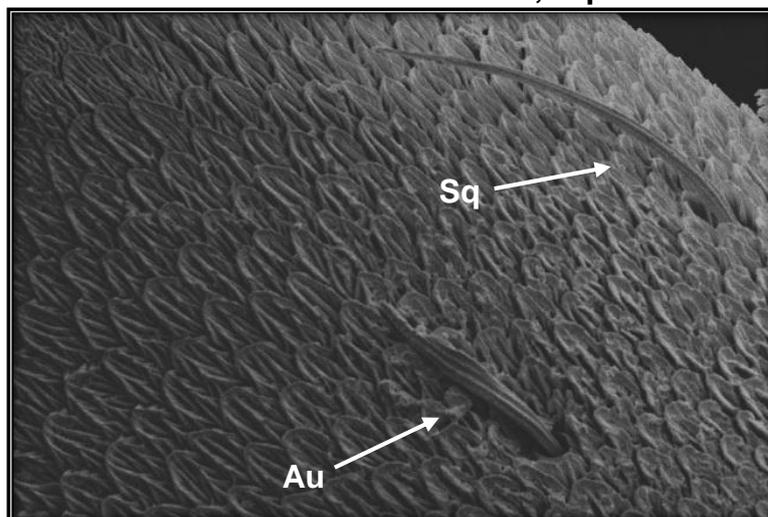
Figura 26 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das antenas de fêmeas de *Opsiphanes invirae*. Sq - sensilas esquamiformes; Sc-escamas



Aumento 600 x

Sensilas auricílicas (Au) são curtas, com forma foliar, e eixo cuticular achatado (Figura 27). Assim como as esquamiformes, estão presentes nos flagelômeros mais basais da antena, e em baixa densidade. São sensilas relacionadas à função olfatória como descrita em *Paysandia archon* (Burmeister, 1880) (Lepidoptera: Castniidae) (RUSCHIONI et al., 2015), e responsáveis pela percepção de voláteis de plantas, como relatado na espécie *Scoliopteryx libatrix* (L., 1758) (Lepidoptera: Noctuidae) (ANDERSON; HALLBERG; SUBCHEV, 2000).

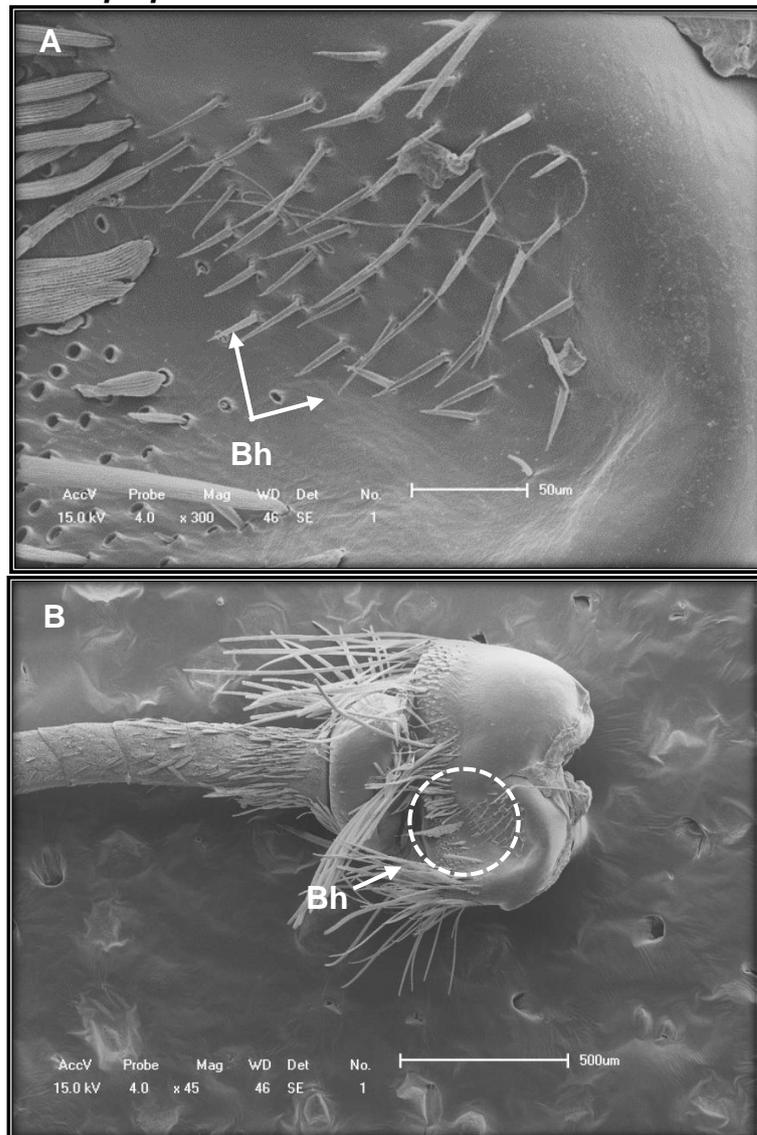
Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das antenas de fêmeas de *Opsiphanes invirae*. Au - sensilas auricílicas; Sq - sensilas esquamiforme



Aumento 600 x

As sensilas de Böhm (Bh) são estruturas que se assemelham a espinhos, com superfícies lisas e presentes em aglomerado (XIANGQUN et al., 2014). Em *O. invirae* foram observadas na base da antena, na região do escapo (Figura 28). São relatadas como mecanorreceptoras para detecção da posição e movimentos da antena (MERIVEE et al., 2002; SCHNEIDER, 1963; YAN et al., 2017).

Figura 28 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das antenas de machos de *Opsiphanes invirae*. Bh - sensilas de Böhm



LEGENDA: A-aumento 300 x; B – aumento 45 x.

3.4 Conclusão

O dimorfismo sexual identificado em *O. invirae* mostra a presença de androcônias, estruturas morfológicas que podem estar associadas ao feromônio de machos desta espécie.

A atividade sexual de *O. invirae* foi caracterizada pelos comportamentos de corte de ambos os sexos, pré-cópula, com a disseminação do feromônio afrodisíaco pelos machos para estímulo sexual das fêmeas, cópula e pós-cópula.

Nas antenas de *O. invirae* foram caracterizadas em ambos os sexos dois tipos de sensilas tricoides, três caéticas, sensilas coleocônicas, esquamiformes, aurículas e de Bohm. As sensilas tricoides foram as mais abundantes, sendo estas reconhecidas por sua função de receptoras de feromônio.

O resultado deste trabalho fornece evidências comportamentais e morfológicas da comunicação química mediada por substâncias que atuam como feromônios entre os sexos de *O. invirae*. Além disso, este estudo fornece informações valiosas de importância prática para o desenvolvimento de métodos de controle baseados em semioquímicos.

4 FEROMÔNIO DE *OPSIPHANES INVIRAE* HUBNER, 1808 (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE)

RESUMO

Opsiphanes invirae (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Nymphalidae) é uma importante praga de areáceas de importância socioeconômica como o coqueiro (*Cocos nucifera* L.) e a palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.). Estes cultivos enfrentam elevadas perdas na produção e qualidade do produto em virtude da infestação de lagartas desfolhadoras como *O. invirae*. O objetivo deste trabalho foi a investigação da ecologia química de *O. invirae*, visando uma estratégia de controle desta praga dentro do contexto do Manejo Integrado de Pragas de areáceas. O estudo apresenta análises químicas e avaliação de campo do efeito da mistura feromonal na referida praga. Os voláteis desta espécie foram obtidos através das técnicas de aeração dinâmica e extração por solvente de partes do corpo do inseto. As análises químicas revelaram a presença de compostos macho-específicos, tais como: linalol, (*E*)- β -Farneseno, (*E*)-nerolidol, (*Z*)-7-hexadeceno e (*Z*)-7-heptadeceno. Estes compostos também fazem parte da composição química das asas posteriores, abdome e regiões odoríferas (androcônias). O composto comum entre os sexos, foi (*E*)- β -ocimeno, encontrado somente na aeração dos adultos. O (*Z*)-7-heptadeceno e o (*E*)-nerolidol são os componentes majoritários nas partes do inseto aqui estudadas. As antenas das fêmeas apresentaram uma resposta significativa aos extratos dos machos nos ensaios eletroantenográficos, indicando, portanto, a presença de compostos biologicamente ativos no macho. Três misturas sintéticas do feromônio foram usadas na avaliação de campo: Tratamento 1, compostos ativos no EAG (*E*)- β -Farneseno, (*E*)-nerolidol e (*Z*)-7-heptadeceno; tratamento 2, compostos ativos no EAG, mais o composto (*E*)- β -ocimeno; tratamento 3, (*E*)- β -farneseno e (*E*)-nerolidol. Foram obtidos resultados similares entre T1 e T2, demonstrando não haver contribuição efetiva do composto (*E*)- β -ocimeno. Os resultados de T1 e T2 foram superiores a T3, portanto a retirada do composto (*Z*)-7-heptadeceno demonstrou diminuir a eficiência da formulação. Todos os tratamentos T1, T2 e T3 apresentaram diferenças significativas ao controle em ao menos um estágio do monitoramento. Os constituintes do proposto feromônio de agregação de *O. invirae* demonstraram potencializar a captura dos adultos nas armadilhas, contribuindo para o manejo desta praga.

Palavras-chave: Lagarta desfolhadora, Androcônia, Coleta Massal.

4.1 Introdução

No processo evolutivo, borboletas e mariposas desenvolveram comportamentos reprodutivos distintos. Em geral, as mariposas fêmeas liberam feromônios sexuais de longo alcance para atração do sexo oposto (ANDERSSON et al., 2007; SARTO MONTEYS et al., 2012). No estudo do comportamento reprodutivo de borboletas, sugere-se que os machos sejam os responsáveis pela liberação do feromônio afrodisíaco (YILDIZHAN et al., 2009). Estes aproximam-se inicialmente das fêmeas de forma visual, para em seguida ocorrer a liberação do feromônio (LI; MATHEWS, 2016). Estas substâncias aromáticas específicas dos machos atuam como feromônios sexuais da espécie, pelo reconhecimento de seu papel na aceitação da fêmea durante o comportamento de corte e acasalamento (ANDERSSON et al., 2007; RUTOWSKI, 1980).

Estudos sugerem que as androcônias seriam os dispositivos de disseminação dos aromas em borboletas (ÔMURA et al., 2013). As androcônias, são as escamas modificadas, presentes especificamente nos machos (BOPPRÉ; SCHNEIDER, 1989; MANN et al., 2017; ROELOFS; CARDE, 1977). A literatura relata, uma diversidade de estruturas morfológicas que liberam esses compostos químicos específicos dos machos, desde estruturas modificadas localizadas nas asas e “tufo de pêlos”, presentes em diferentes regiões como, abdômen, pernas e tórax (GANAI et al., 2017; ROELOFS ; CARDE, 1977).

No manejo integrado de pragas, o uso de semioquímicos como o feromônio sexual de insetos, representa um dos maiores avanços em estratégias de controle de insetos-pragas. Esta ferramenta além de aumentar a eficiência dos métodos de controle existentes, tem contribuído para a preservação do meio ambiente (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009).

Poucas são as informações disponíveis em relação ao feromônio de *O. invirae* (AUSTIN et al., 2007; BARTH, 1980), não havendo relatos sobre a identificação e avaliação a campo dos constituintes de seu feromônio. Essa informação também não está disponível para nenhuma das 13 espécies e 68 subespécies descritas no gênero *Opsiphanes* (DA NEVES, 2016; PENZ, 2007).

O. invirae é uma importante praga de plantas da família *Arecaceae* de relevante interesse socioeconômico, como o coqueiro (*Cocos nucifera* L.) e a palma de óleo (*Elaeis guineenses* Jacq.), tendo sua ocorrência em toda extensão do mouro da

América do Sul (FERREIRA et al., 2015; LEMOS; BOARI, 2010; PENZ; AIELLO; SRYGLEY, 1999).

Durante o estágio de lagarta causa a destruição dos folíolos, reduzindo a área foliar, o que prejudica a transpiração e a fotossíntese (FERREIRA; LINS, 2006). Estes fatores atrasam o desenvolvimento das culturas cultivadas, aumentando os custos de produção.

Até então, a metodologia mais utilizada para redução da população de adultos de *O. invirae*, ocorre com o uso de armadilhas para coleta massal, contendo melaço de cana-de-açúcar como atrativo alimentar, e em algumas situações adicionada de solução inseticida (LEMOS; BOARI, 2010; FERREIRA et al., 2015). Das espécies vegetais relatadas como hospedeiras de *O. invirae* apenas para as culturas do coqueiro, palma de óleo e bananeira é recomendado o produto Dipel® à base do ingrediente ativo *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*, para o controle da lagarta da referida praga (AGROFIT, 2003; BRASIL, 2010). Essa carência de produtos registrados para controle de *O. invirae*, juntamente com a expansão dos cultivos de palma de óleo nos últimos anos (CORLEY, 2009), favorece a busca de outras medidas de controle seguras e seletivas para culturas nas quais a praga pode se tornar um problema.

Neste trabalho relatamos a identificação dos potenciais compostos do feromônio de *O. invirae*, as estruturas morfológicas envolvidas na liberação deste, e os resultados da avaliação de atratividade em campo com as misturas sintéticas do proposto feromônio.

4.2 Materiais e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN) do Centro de Ciências Agrárias-CECA, da Universidade Federal de Alagoas-UFAL, no Laboratório do Grupo Agropalma S/A, no município de Tailândia/PA e Laboratório de Fitossanidade da Fazenda Sococo S/A, no município de Mojú/PA.

4.2.1 Coleta dos insetos

Os insetos utilizados no experimento foram coletados na fase de crisálida em plantios da palma de óleo na fazenda do Complexo Agropalma S/A (02° 31' 31" S e 48° 45' 7"), localizada no município de Tailândia, e de coqueiro na fazenda Sococo S/A (02° 7' 11" S e 48° 38' 45" W), no município de Mojú, ambas no estado do Pará. As crisálidas foram coletadas com auxílio de ferramentas de corte (foice com cabo e tesoura de poda) em plantas adultas e jovens para retirada das folhas nas quais as crisálidas estavam aderidas (Figura 29). Após coleta, todo material foi encaminhado para os laboratórios das respectivas fazendas, e posteriormente, transportados para o Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN) da Universidade Federal de Alagoas-UFAL (9° 33' 17" S e 35° 46' 33"), no município de Maceió, estado de Alagoas. No laboratório foram realizados cortes cuidadosos nos folíolos que continham as crisálidas, a fim de minimizar os danos durante o manuseio para a retirada das estruturas foliares. O período de coleta ocorreu de dezembro de 2015 a maio de 2017, perfazendo um total de nove coletas.

Após obtenção dos adultos, alguns exemplares foram encaminhados ao Museu de Entomologia da ESALQ, onde foram identificados pelo Dr. Sinval Silveira Neto como *Opsiphanes invirae* Hubner, 1808 (Lepidoptera: Nymphalidae).

Figura 29 - Métodos de coleta de *Opsiphanes invirae* em plantio de palma de óleo



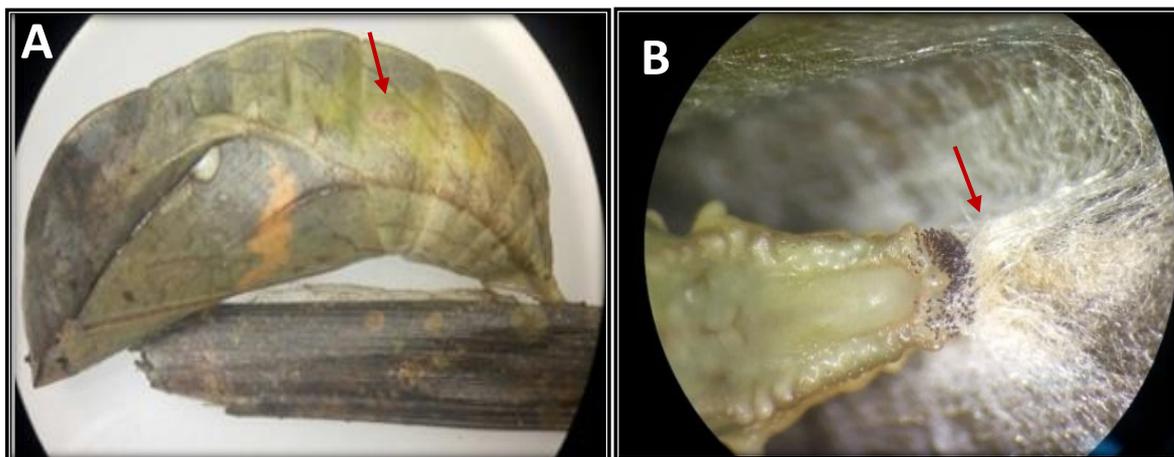
Fonte: Autora, 2018.

LEGENDA: A) plantio adulto;
B) folíolos da palma de óleo com crisálidas e lagartas;
C) plantio jovem;
D) corte dos folíolos com tesoura de poda para obtenção das crisálidas

Em virtude da necessidade de insetos virgens para extração dos voláteis, no laboratório LPqRN, as crisálidas eram colocadas em bandejas e iniciado o processo de sexagem (Figura 30A). Após este procedimento, estas eram acondicionadas em gaiolas confeccionadas com tela e madeira, sendo penduradas cuidadosamente na tela através do fio de seda presente nas pupas com uso de um grampo (Figura 30B). Este processo era realizado a cada obtenção de crisálidas para garantir a emergência dos insetos virgens de forma saudável, assemelhando-se ao ambiente natural. Após emergência, os insetos eram alimentados com solução de melação a

15%, ou com frutas em fermentação, e mantidos em condições de semi-campo a 26 ± 2 °C, UR: $68 \pm 5\%$, para posterior utilização nas análises morfológica e química.

Figura 30 - A) Crisálida macho de *Opsiphanes invirae* próximo a emergência (seta indicando a mancha característica presente apenas nos indivíduos machos); B) detalhe do fio de seda usado para pupação



Fonte: Autora, 2018; Jakeline Santos, 2018.

4.2.2 Extração e isolamento do feromônio de *Opsiphanes invirae*

As extrações dos voláteis ocorreram através da técnica de aeração e extração por solvente de partes do inseto. Os insetos utilizados para a obtenção dos extratos foram adultos entre 24 e 72 horas após a emergência.

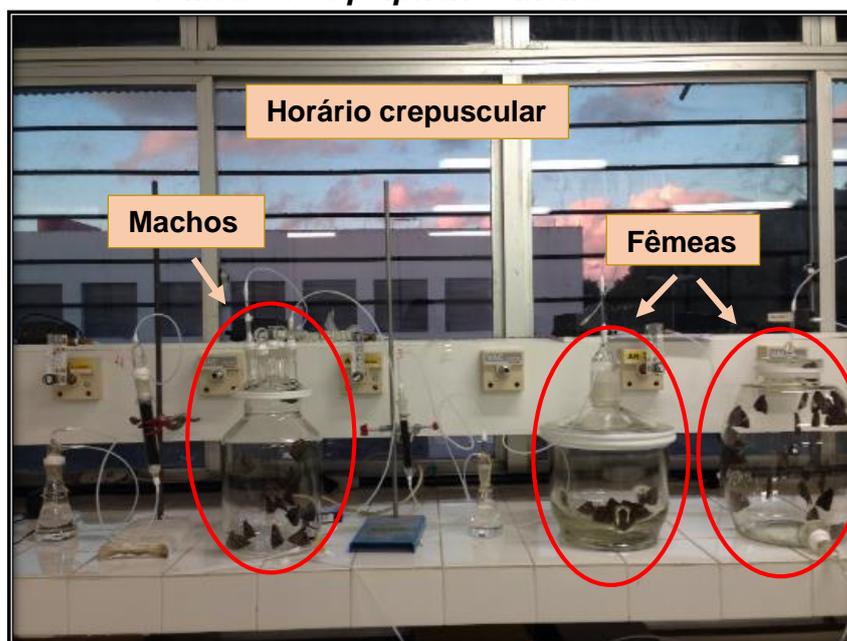
Nesta etapa toda a vidraria utilizada foi previamente limpa com os solventes grau HPLC, hexano bidestilado (PANREAC) e metanol (PANREAC)), e posteriormente colocadas para secar na estufa à 150°C, por 12 horas.

4.2.2.1 Processo de aeração

Na aeração, grupos de 25 a 60 insetos adultos virgens (machos e fêmeas separadamente), eram acondicionados em uma câmara de vidro (11 cm de altura e 7 cm de diâmetro), em um sistema fechado, sobre fluxo contínuo de ar sintético (1L/min) previamente filtrado com carvão ativado. Os insetos permaneceram no sistema por um período de 16 horas, no intuito de abranger os crepúsculos matutino e vespertino, uma vez que o comportamento reprodutivo desta espécie ocorre neste período (Figura 31). Os voláteis liberados pelos insetos dentro da câmara foram

adsorvidos em uma coluna contendo 50 mg do polímero adsorvente Porapack (50-80 mesh, Waters Corporation) colocada na saída do sistema. A limpeza da coluna com Porapack foi realizada com dois mL do solvente hexano, e aquecida à 120°C, durante duas horas, antes de fixá-la ao sistema. A dessorção dos compostos adsorvidos no sistema foi realizada com 500 µL de hexano bidestilado grau HPLC, armazenados em vial com capacidade de dois mL. As amostras foram conservadas em baixa temperatura em um freezer (-20° C), a fim de evitar perda de material, e garantir posteriores análises. Uma média de 10 repetições de amostras de aeração para cada sexo foram coletadas.

Figura 31 - Sistema de aeração utilizado para coleta de voláteis de machos e fêmeas de *Opsiphanes invirae*



Fonte: Autora, 2018.

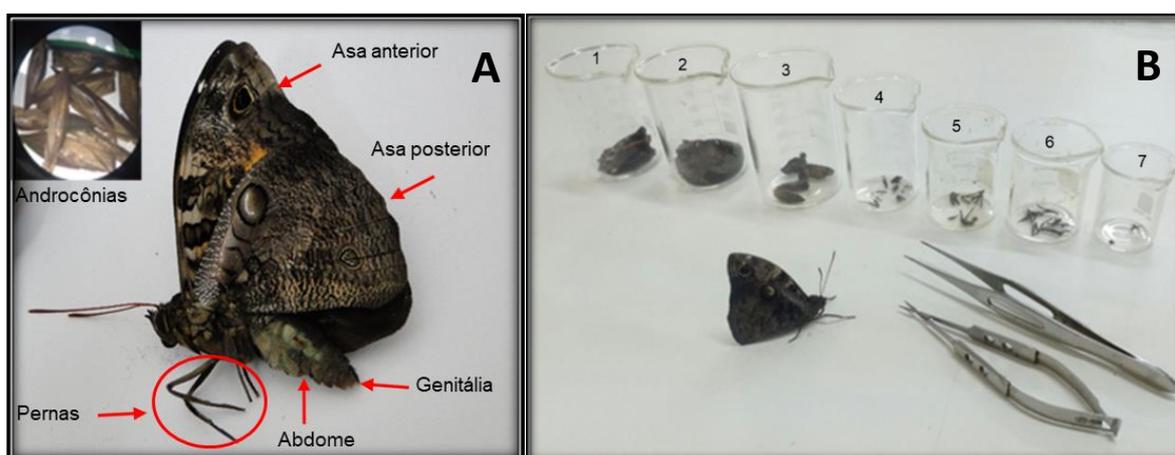
4.2.2.2 Extração cuticular por solvente das partes do corpo de machos e fêmeas de *Opsiphanes invirae*

Os extratos por solvente de partes do inseto foram obtidos de machos e fêmeas virgens com no mínimo 10 exemplares de cada sexo, com 24 a 72 horas de idade. As extrações ocorreram somente no horário de comportamento reprodutivo desta espécie, no período crepuscular. Os insetos foram previamente selecionados para o procedimento de extração e levados para ambientação no laboratório uma

hora antes de iniciar as atividades. Para facilitar o manuseio dos insetos adultos durante a extração, estes eram anestesiados no congelador por um minuto, posteriormente, era realizado o desprendimento das asas anteriores e posteriores, do primeiro, segundo e terceiro pares de pernas (classificando-as como perna anterior, mediana e posterior), do abdome e genitália (Figura 32). Além destas, foram realizados extratos das asas com e sem androcônias.

Todas as partes foram removidas com tesouras de dissecação, e imersas em hexano (grau HPLC, bidestilado) nas seguintes medidas: para cada par de asas foi utilizado 50 μ l, para o abdome e androcônias 50 μ l, pernas e genitália 20 μ l, e asa posterior sem androcônias 50 μ l. Após o período de 20 min, o sobrenadante foi filtrado em uma coluna de lã de vidro, preparada em uma pipeta de pasteur de vidro, e em seguida, transferidos para um vial com capacidade de dois mL, e conservados em refrigeração (-20^o C) para posterior análise. Foi obtido para cada extrato, um acúmulo de 40 partes do inseto, totalizando 4 repetições para cada parte.

Figura 32 – A) Regiões utilizadas para preparação dos extratos de *Opsiphanes invirae*; B) béqueres contendo diferentes estruturas do inseto para extração cuticular por solvente de machos e fêmeas virgens: 1= asas anteriores; 2=asas posteriores; 3= abdome; 4, 5 e 6= pernas anteriores, medianas e posteriores; 7= genitália



Fonte: Autora, 2018

4.2.3 Identificação do feromônio de *Opsiphanes invirae*

4.2.3.1 Análise dos extratos obtidos de *Opsiphanes invirae* por Cromatografia Gasosa (GC-FID) e (GC-MS)

A identificação dos compostos presentes nas amostras de aeração e dos extratos das partes do inseto ocorreram por meio da análise em um cromatógrafo gasoso (ShimadzuGC-2010), acoplado a um detector de ionização em chama (FID). Uma alíquota de 1 μL das amostras de aeração e extração das partes dos machos e das fêmeas foi injetada no cromatógrafo no modo splitless à 250 °C, e a detecção à 300°C. A cromatografia foi realizada nas colunas capilares RTx-1 (30m x 0,25mm d.i. x 0,25 μm Restek®) e RTx-5 (30m x 0,25mm d.i. x 0,25 μm Restek®). As condições de análise para a separação dos componentes foram de 50°C temperatura inicial, durante cinco minutos, e em seguida elevada a uma taxa de 10°C/min até 300°C, sendo mantida nessa temperatura por 10 min, nas duas colunas. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio, com fluxo de 1.79 mL/min. A análise dos cromatogramas obtidos das amostras e dos extratos de machos e fêmeas foram comparados para detectar compostos químicos específicos de cada sexo.

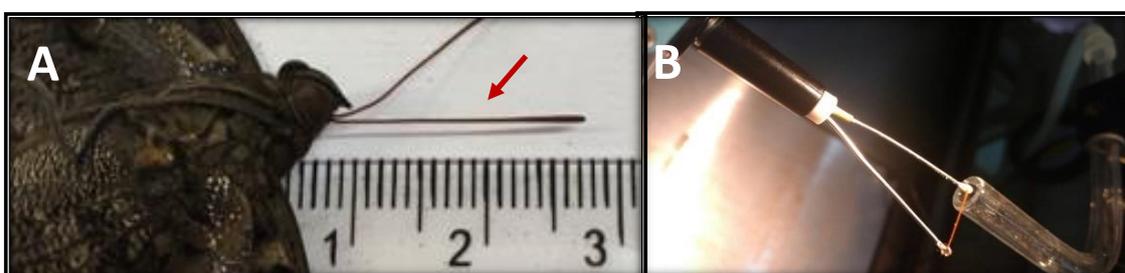
Os espectros de massa foram obtidos em um cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (GC-MS) – QP 2010 Ultra (Shimadzu) operando com modo de ionização por impacto de elétrons a 70eV. As amostras foram eluídas utilizando coluna Rtx – 5 (30m x 0.25mm d.i. x 0.25 μm , Restek®) sob um fluxo de 1.79 mL/min e RTx-1 (30m x 0,25mm d.i. x 0,25 μm Restek®), e hélio como gás de arraste. O modo de injeção e as condições de análise do forno foram as mesmas do GC-FID. Os compostos químicos foram identificados pela comparação de seus índices de Kovats (IKs), usando uma solução padrão de alcanos de 7 a 30 átomos de carbono (SIGMA-ALDRICH), por suas características de fragmentação no espectrômetro de massas, comparação com os espectros da biblioteca e com o padrão analítico das substâncias nas duas colunas. Na identificação estrutural dos compostos foram utilizados os espectros de massas do banco de dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, 2008 (NIST08 e NIST08s) e da biblioteca Wiley 229, ou utilizando os índices de retenção (publicados nos sites Pherobase e NIST Chemistry Web Book) e confirmados pela co-injeção de padrões. As soluções de

padrões analíticos comerciais da marca Sigma-Aldrich e AkScientific foram preparados na concentração de 50 mg/L em hexano grau HPLC, bidestilado. A posição da dupla ligação dos compostos (*Z*)-7-hexadeceno e (*Z*)-7-heptadeceno foi determinada mediante derivatização do extrato com dissulfeto de dimetila (DMDS) e o composto foi confirmado através da síntese. Os compostos nas amostras foram quantificados por normalização de áreas usando eicosano (50 mg/L) como padrão interno.

4.2.3.2 Identificação dos compostos bioativos para o inseto por Eletroantenografia (GC-EAG)

A análise dos efeitos das amostras das amostras de aeração e extratos das partes do inseto sobre a antena dos adultos, ocorreu através da técnica de eletroantenografia. Os exemplares de *O. invirae* foram anestesiados em baixa temperatura (-10° C) por um minuto, e em seguida, com uso de pinça e tesoura entomológica, a antena foi removida cuidadosamente desde a base e fixada no eletrodo de prata do sistema EAG, sendo o ápice da antena colocado no eletrodo de trabalho e a base da mesma fixada no eletrodo de referência (Figura 33). Um gel condutor de eletricidade (Sigma Gel; Parker Laboratories, Inc., Fairfield, NJ) foi utilizado para cobrir as extremidades da antena no eletrodo (MORAES et al., 2008).

Figura 33 - Antena de *Opsiphanes invirae*



Fonte: Autora, 2018.

A) detalhe da antena;

B) antena acoplada aos eletrodos de prata no CG-EAD

Inicialmente, as antenas dos machos e fêmeas dos insetos, receberam pulsos de ar contendo as amostras de ambos os sexos. Como forma de controle, pulso do ar e do hexano foram utilizados durante o teste. Adicionou-se 10 μ L das amostras

testadas (extratos da aeração de machos e fêmeas) sobre um papel de filtro (2,0 cm x 1,0 cm), e em seguida foi inserido em uma pipeta de pasteur de vidro. Esta pipeta foi conectada ao sistema gerador de pulsos (StimulusController, Type CS-55, Syntech), o pulso foi mantido durante 0,3 s. Os estímulos de ar, hexano, e extratos cuticulares das asas e abdome do macho foram utilizados em antenas de ambos os sexos de *O. invirae*. Em seguida, as amostras dos voláteis de aeração de machos e fêmeas foram avaliadas em antenas de fêmeas. Cada antena testada recebeu estímulo de todos os tratamentos sequencialmente por três vezes, e ao término de cada série (3x) trocava-se as antenas. Um total de 10 antenas de cada sexo foram avaliadas (PENG et al., 2012). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (Past 3.19), a 5% de probabilidade.

4.2.2.3 Avaliação da atividade biológica do feromônio na captura de *Opsiphanes invirae* em condições de campo

Para verificar a atratividade dos adultos para a formulação do proposto feromônio, realizamos um teste com três misturas feromonais sintéticas em uma área de monocultura de palma de óleo na fazenda Agropalma S/A, localizada no município de Tailândia, Pará. A presente avaliação realizou-se com armadilhas confeccionadas com sacos plásticos, contendo o atrativo alimentar (melaço) e as misturas a serem testadas. Na preparação das armadilhas iscadas, foram colocados um septo contendo a formulação feromônica, e separadamente, uma garrafa pet de 250 mL com pequenas aberturas contendo 100 mL da solução de melaço (50% água e 50% melaço), ambos fixados às sacolas com um arame de aproximadamente 25cm (Figuras 34A e 34B). As armadilhas (80 cm de altura e 55 cm de comprimento) possuíam uma abertura de aproximadamente 8cm, e foram fixadas às plantas de palma de óleo em média à 100cm do solo (Figuras 34C, 34D e 34E).

Figura 34 - Preparação das armadilhas para teste de atratividade com as misturas do feromônio de *Opsiphanes invirae*



Fonte: Autora, 2018.

LEGENDA: A) septos contendo as misturas;

B) detalhe da pequena abertura na garrafa pet com melaço (fonte alimentar);

C) detalhe da abertura na sacola (armadilha);

D e E) armadilhas preparadas com septo e melaço presos ao arame

Foram testados quatro tratamentos (denominados de T1, T2, T3 e T4) com três repetições, totalizando 12 armadilhas distribuídas no plantio de palma de óleo. Todos os tratamentos possuíam em comum a presença do melaço como atraente alimentar. Os tratamentos T1, T2 e T3 continham as seguintes misturas feromonais: T1: farneseno, nerolidol e 7-heptadeceno; T2: ocimeno, farneseno, nerolidol e 7-

heptadeceno; T3: nerolidol e farneseno. Utilizou-se a dosagem de 5mg nas três misturas avaliadas. Como controle, utilizou-se o tratamento quatro (T4), que possuía somente melão. As armadilhas foram distribuídas nas esquinas e corredores das parcelas, com ocorrência de insetos, a uma distância de aproximadamente 160m. A troca das armadilhas ocorreu a cada monitoramento, utilizando sacolas limpas e substituindo o melão. O septo contendo o feromônio permanecia o mesmo.²⁷

O experimento foi realizado por um período de 19 dias, com os monitoramentos sendo realizados aproximadamente a cada 4 dias, totalizando 5 monitoramentos. As armadilhas provenientes de cada monitoramento foram transportadas ao laboratório de Fitossanidade do Grupo Agropalma S/A para sexagem e contagem dos insetos capturados. Os bioensaios ocorreram nos meses de setembro a outubro de 2017, com temperatura média de $27,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, e umidade relativa de $80 \pm 3\%$.

Os dados de frequência foram analisados pelo teste estatístico do qui-quadrado tabelado para 3 graus de liberdade a 5 e 1% de probabilidade, utilizando o programa Genes (CRUZ, 2013; 2016).

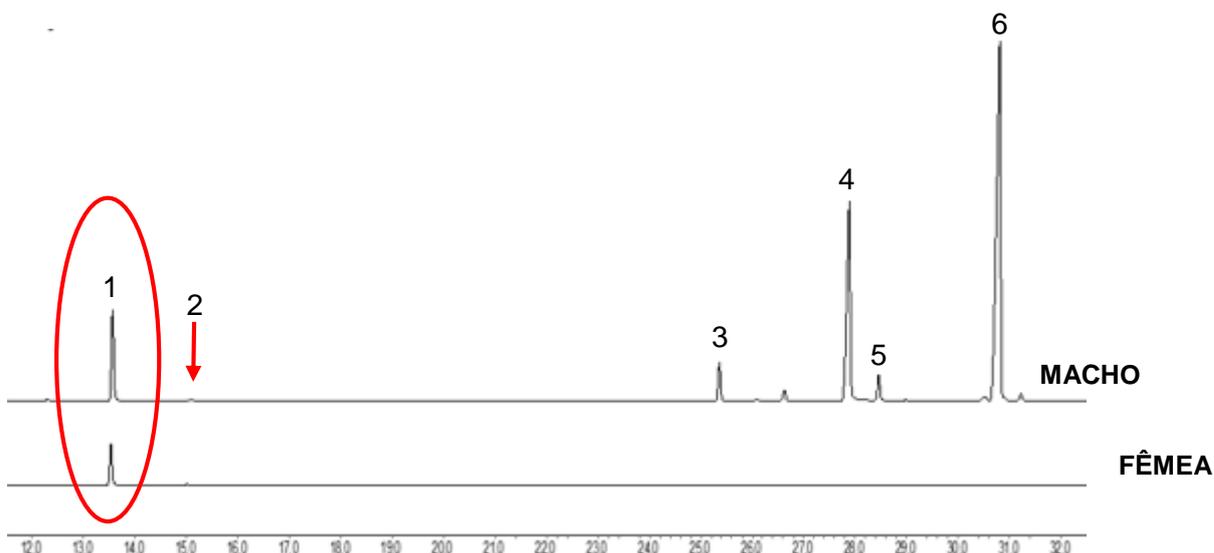
4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Identificação do feromônio de *Opsiphanes invirae*

4.3.1.1 Aeração

A comparação dos cromatogramas de voláteis obtidos na aeração de machos e fêmeas, indicou a presença de cinco compostos produzidos somente pelo macho e apenas um composto comum à fêmea. A figura 35 representa a sobreposição dos cromatogramas de machos e fêmeas analisados.

Figura 35 - Cromatogramas dos voláteis de aeração de machos e fêmeas virgens de *Opsiphanes invirae*, com idade entre 24 a 72 h, evidenciando a presença de compostos macho-específico



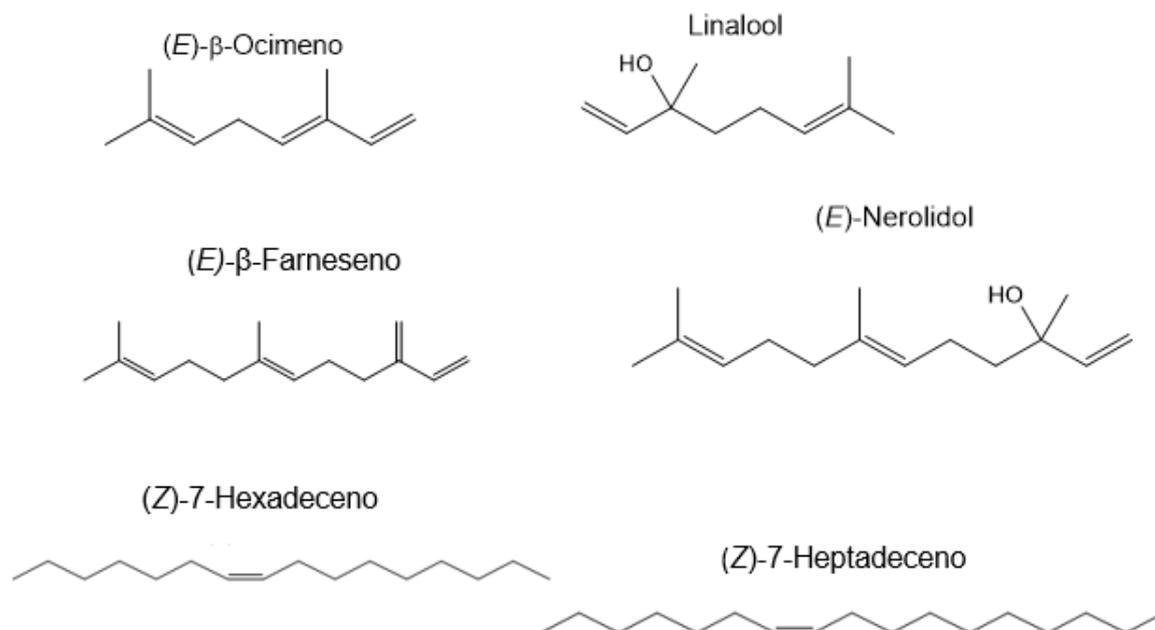
A tabela 2 corresponde aos compostos identificados nas análises de CG-EM, e indica o composto proposto para cada pico cromatográfico, o índice de Kovats (IK) calculado e comparado com os índices de Kovats registrados ou obtidos com padrões. A figura 36 corresponde às estruturas dos compostos químicos identificados na referida análise. Somente foram considerados na discussão os compostos que estiveram presentes nas 10 repetições de cada amostra.

Tabela 2 - Composição química correspondente aos picos presentes nas amostras de aeração de machos e fêmeas de *Opsiphanes invirae*

Nº do pico	Composto	IK ^a Calculado	IK ^b Calculado	IK ^c do Padrão	MM (g/mol)	Ponto de ebulição
1	(<i>E</i>)- β -ocimeno	1049	1033	1032	136	176-178° C
2	Linalol	1077	1077	1077	154	194-197° C
3	β -Farneseno	1457	1408	1406	204	272-273° C
4	(<i>E</i>)-Nerolidol	1565	1502	1503	222	276-277° C
5	(<i>Z</i>)-7-Hexadeceno	1580	1527	1523	224	284-285° C
6	(<i>Z</i>)-7-Heptadeceno	1682	1619	1614	238	305° C

^aIK-Índice de Kovats calculado em coluna RTX-5; ^bIK-Índice de Kovats calculado em coluna RTX-1; ^c IK- Índice de Kovats calculado com padrões em coluna RTX-1; MM-Massa molecular.

Figura 36 - Estrutura dos compostos identificados nos voláteis de areação de *Opsiphanes invirae*



O pico um corresponde ao composto presente nos voláteis de fêmeas e machos, identificado como β-ocimeno (Figura 37). A injeção do padrão sintético confirmou a configuração (E) da dupla ligação no composto presente nos insetos, apresentando maior tempo de retenção em coluna apolar que o isômero (Z) (Figura 38).

Figura 37 - Espectro de massas do composto 1: (E)-β-ocimeno dos voláteis de areação de *Opsiphanes invirae*

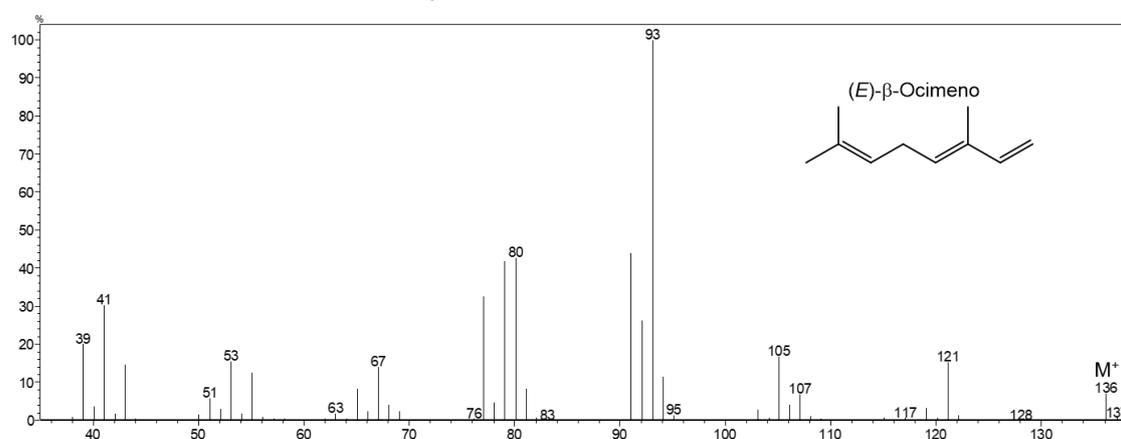
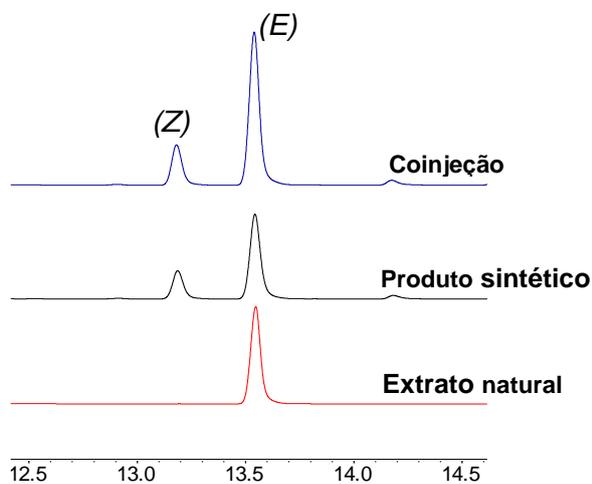


Figura 38 - Cromatograma resultante da coinjeção em coluna RTX-1 do composto produzido por machos e fêmeas de *Opsiphanes invirae* e do (E)- β -ocimeno



O segundo composto identificado foi o linalol (Figura 39). De igual forma foi confirmado pela comparação com padrão sintético (Figura 40).

Figura 39 - Espectro de massas do composto 2: Linalol nos voláteis de aeração do macho de *Opsiphanes invirae*

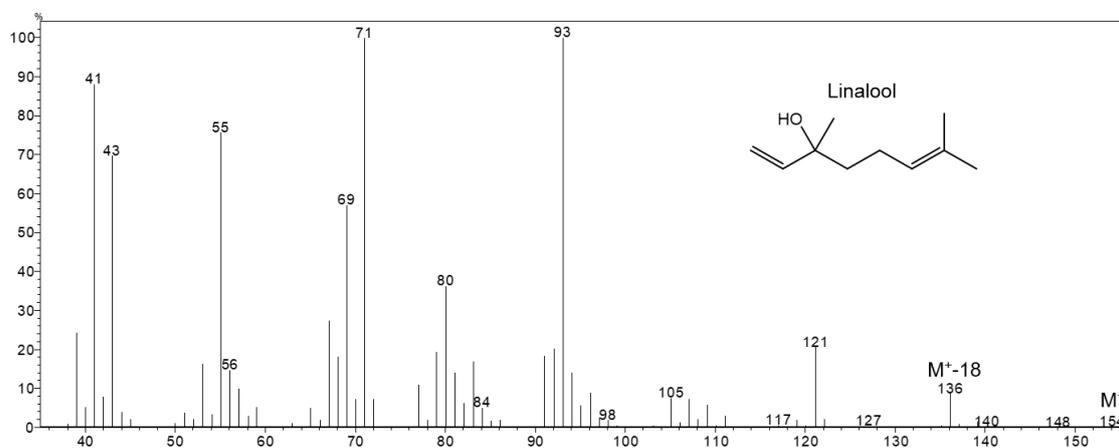
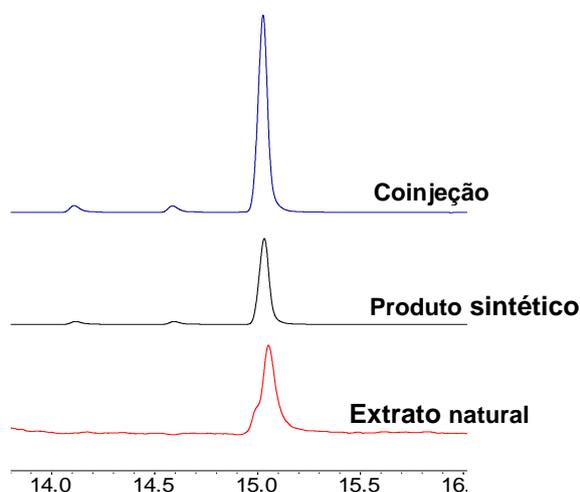


Figura 40 - Cromatograma resultante da coinjeção em coluna RTX-1 do composto produzido pelos machos *Opsiphanes invirae* e do linalol



O espectro de massas do pico três, corresponde ao composto farneseno (Figura 41). A configuração *E* foi confirmada pela coinjeção do padrão sintético (Figura 42).

Figura 41 - Espectro de massas do composto 3: (*E*)- β -Farneseno nos voláteis de aeração do macho de *Opsiphanes invirae*

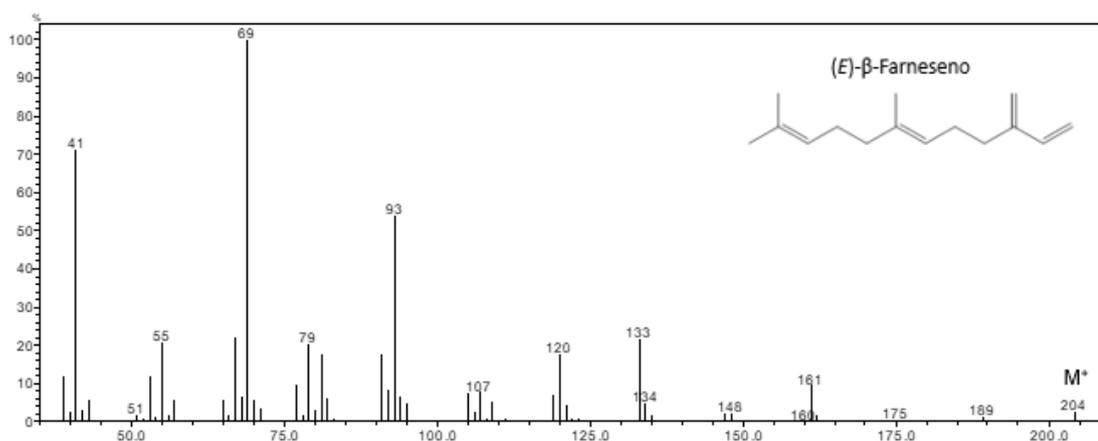
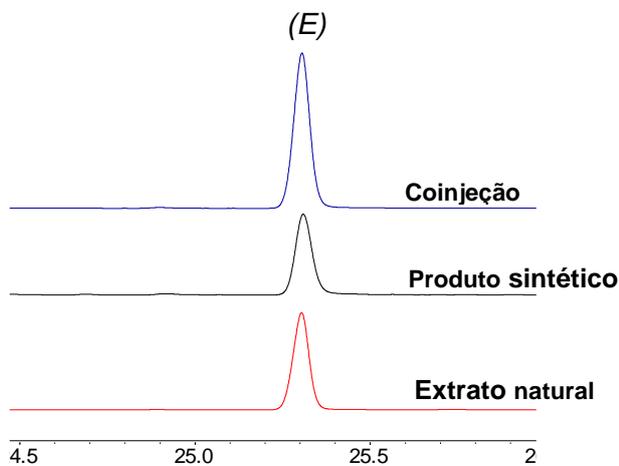


Figura 42 - Cromatograma resultante da coinjeção em coluna RTX-1 do composto produzido pelos machos *Opsiphanes invirae* e do (*E*)- β -Farneseno



Outro terpeno presente nos voláteis de machos é o nerolidol (Figura 43). A coinjeção do padrão sintético confirmou a configuração *E* do composto (Figura 44).

Figura 43 - Espectro de massas do composto 4: (*E*)-Nerolidol nos voláteis de aeração do macho de *Opsiphanes invirae*

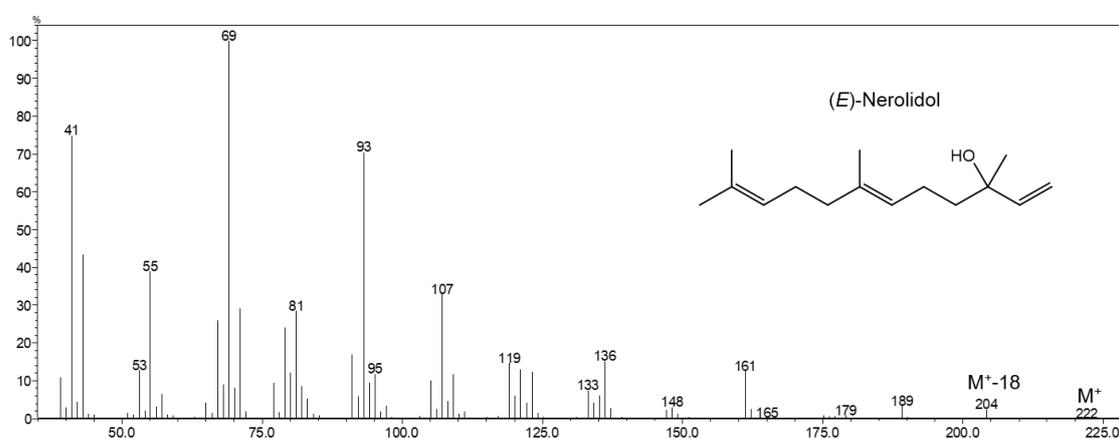
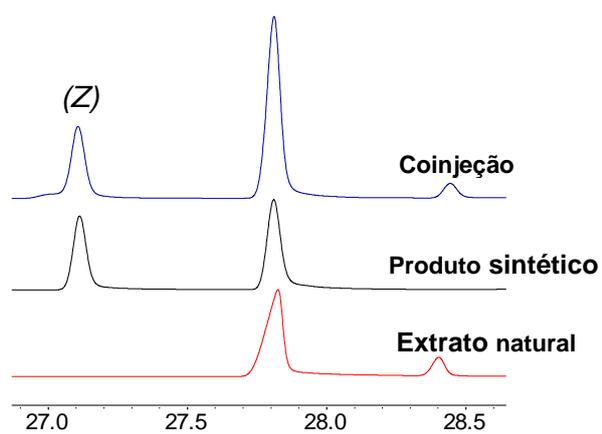


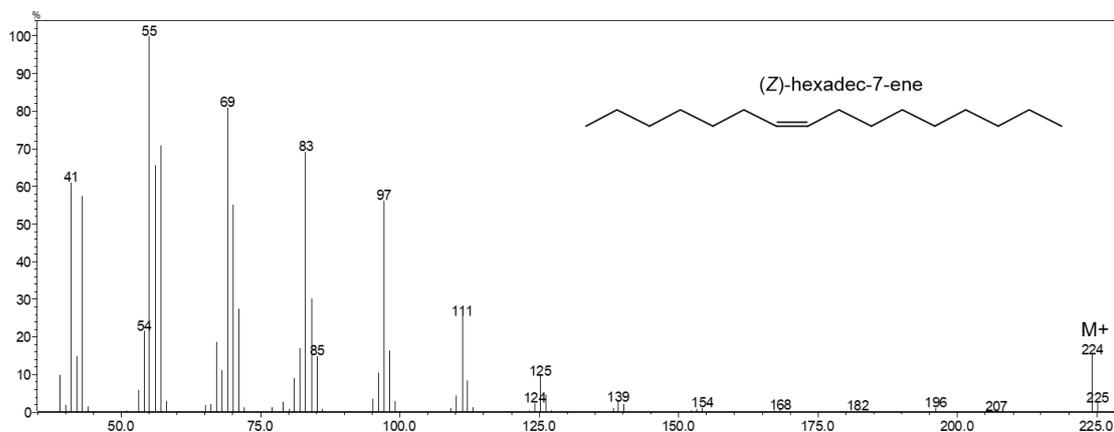
Figura 44 - Cromatograma resultante da coinjeção em coluna RTX-1 do composto produzido pelos machos *Opsiphanes invirae* e do (*E*)-Nerolidol

(*E*)



Os compostos 5 e 6 correspondem a hidrocarbonetos monoinsaturados, identificados como hexadeceno (Figura 45) e heptadeceno (Figura 48).

Figura 45 - Espectro de massas do composto 5: (Z)-7-Hexadeceno nos voláteis de aeração do macho de *Opsiphanes invirae*



A derivatização do hexadeceno foi realizada no intuito de identificar a posição da dupla ligação. O espectro de massas (Figura 46) do composto após derivatizado, apresentou pico íon molecular m/z 318 e dois íons m/z 145 e 173 indicando a dupla ligação em posição sete. A conformação da dupla ligação foi confirmada sendo (Z) pela comparação com padrão sintético (Figura 47).

Figura 46 - Espectro de massas do composto derivatizado 5: (Z)-7-hexadeceno nos voláteis de aeração do macho de *Opsiphanes invirae*

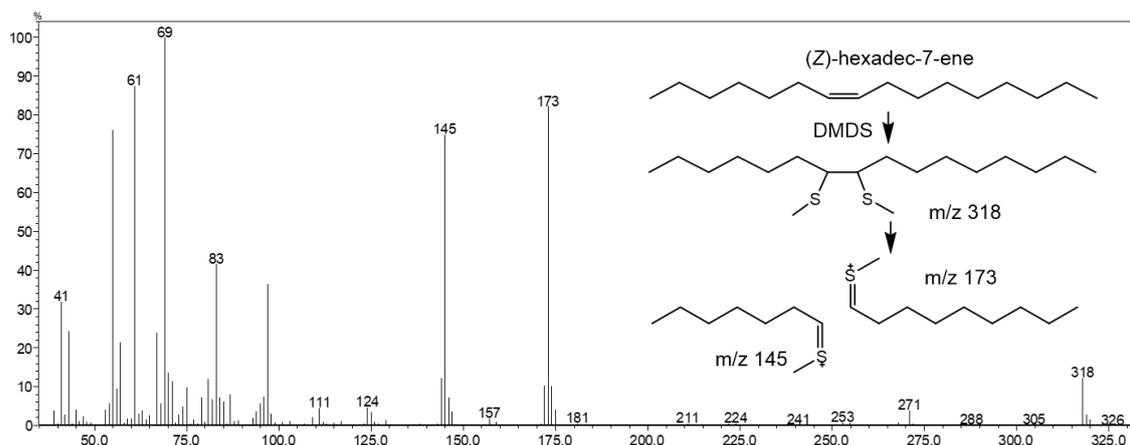
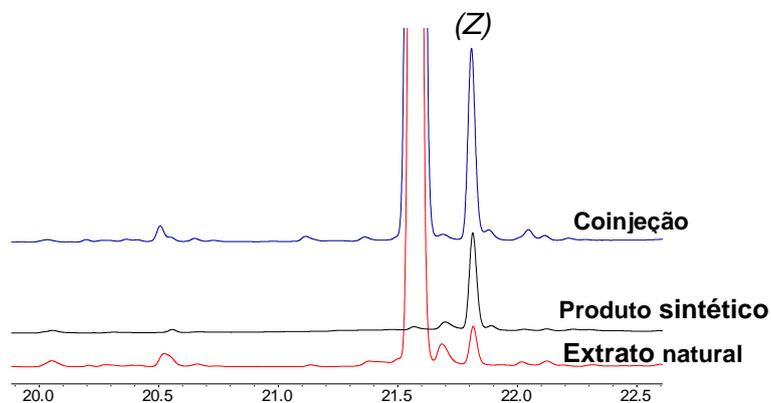
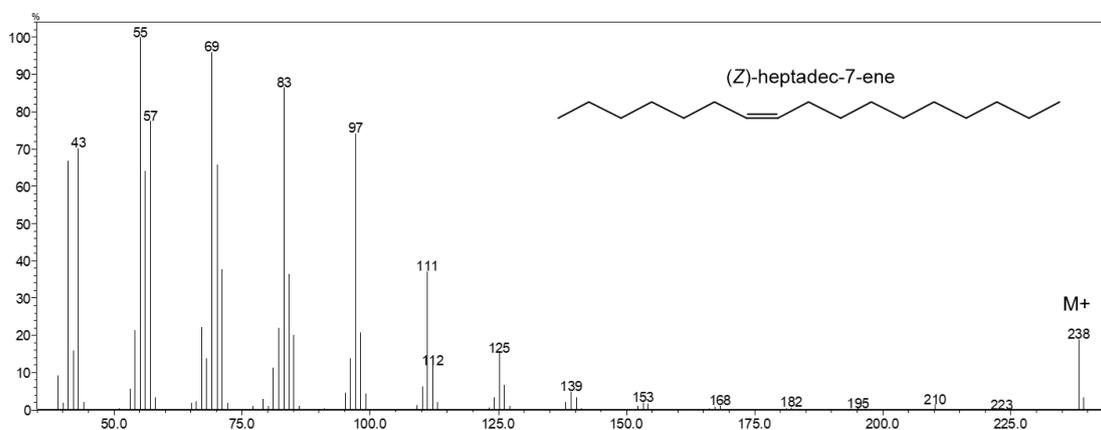


Figura 47 - Cromatograma resultante da coinjeção em coluna RTX-1 do composto produzido pelos machos *Opsiphanes invirae* e do (Z)-7-Hexadeceno



O espectro de massas do heptadeceno (Figura 48) apresenta fragmentação similar ao hexadeceno.

Figura 48 - Espectro de massas do composto 6: (Z)-7-Heptadeceno nos voláteis de aeração do macho de *Opsiphanes invirae*



A derivatização do heptadeceno (Figura 49) apresentou pico íon molecular m/z 222 e dois íons m/z 145 e 187 indicando a dupla ligação em posição sete. A conformação da dupla ligação foi confirmada sendo (Z) pela comparação com padrão sintético (Figura 50).

Figura 49 - Espectro de massas do composto derivatizado 6: (Z)-7-Heptadeceno nos voláteis de aeração do macho de *Opsiphanes invirae*

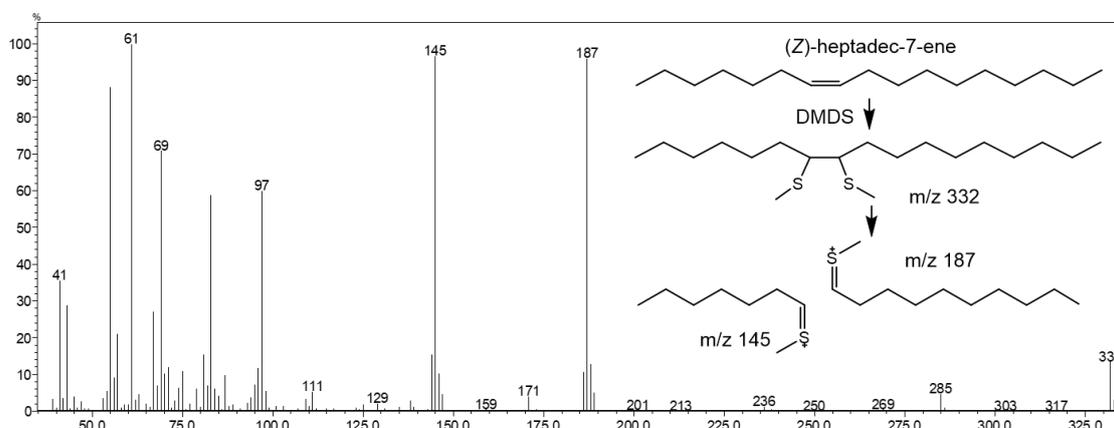
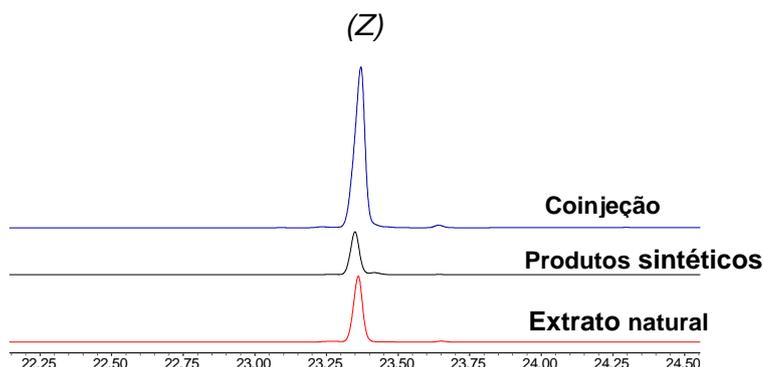


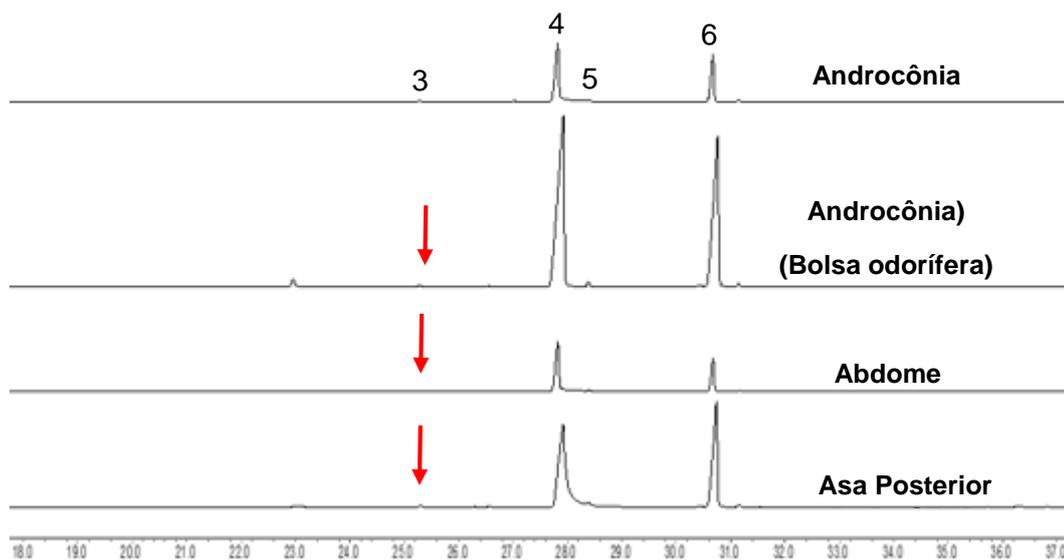
Figura 50 - Cromatograma resultante da coinjeção em coluna RTX-1 do composto produzido pelos machos *Opsiphanes invirae* e do (Z)-7-heptadeceno



4.3.1.2 Extração cuticular por solvente de partes do corpo de *Opsiphanes invirae*

Análises cromatográficas foram realizadas com os extratos cuticulares das partes do corpo de fêmeas e machos, com idade de 24 a 72 horas. Na comparação dos extratos hexânicos das partes do macho e da fêmea, verificou-se a presença dos compostos específicos do macho: (*E*)- β -farneseno, (*E*)-nerolidol, (*Z*)-7-hexadeceno e (*Z*)-7-heptadeceno nas regiões do abdome, asa posterior e regiões androconiais (região cinza-marrom e bolsa odorífera) (Figura 51). Em contrapartida verificou-se ausência do composto (*E*)- β -ocimeno e linalol em todas as amostras dos extratos das partes do inseto, em ambos os sexos.

Figura 51 – Cromatogramas das amostras dos extratos hexânicos de partes de *Opsiphanes invirae* confirmando a presença de compostos macho-específico. Compostos presentes na asa posterior, abdome e androcônias (bolsa odorífera e região cinza-marrom): 3- (*E*)- β -Farneseno; 4- (*E*)-nerolidol; 5- (*Z*)-7-hexadeceno; 6- (*Z*)-7-heptadeceno



Os resultados da análise dos voláteis de aeração e dos extratos por solvente das asas posteriores confirmam a presença dos compostos macho-específico de *O. invirae*: (*E*)- β -Farneseno, (*E*)-nerolidol, (*Z*)-7-hexadeceno e (*Z*)-7-heptadeceno (Figura 52). A tabela 3 corresponde ao índice de Kovats (IK) calculado dos compostos presentes nos extratos das asas posteriores.

Figura 52 – Cromatogramas dos voláteis de aeração e extrato hexânico da asa posterior dos machos virgens de *Opsiphanes invirae* com idade entre 24 a 72 h. Compostos macho-específico: 3- (*E*)- β -Farneseno; 4- (*E*)-nerolidol; 5- (*Z*)-7-hexadeceno; 6- (*Z*)-7-heptadeceno

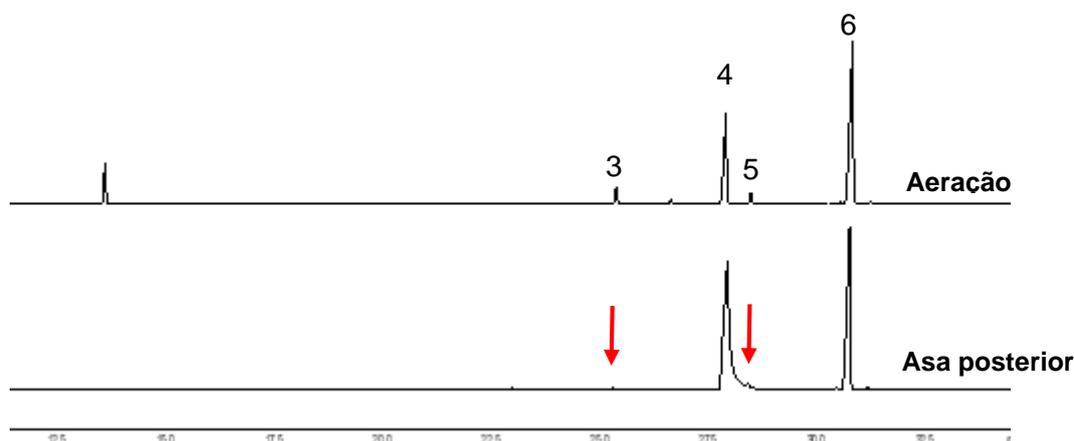


Tabela 3 - Índice de Kovats correspondente aos compostos no extrato da asa posterior dos machos de *Opsiphanes invirae*

Nº do pico	Composto	IK ^a Calculado	IK ^b Calculado	M
1	(E)-β-Farneseno	1457	1408	+
2	(E)-Nerolidol	1566	1503	+
3	(Z)-7-Hexadeceno	1580	1527	+
4	(Z)-7-Heptadeceno	1681	1618	+

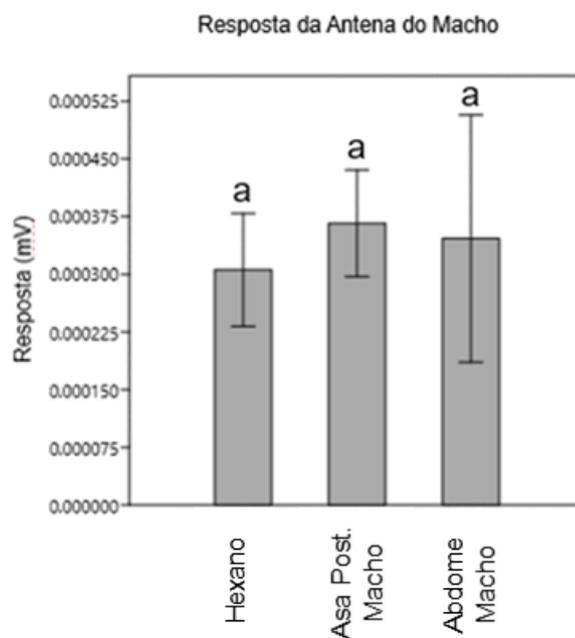
^aIK-Índice de Kovats calculado em coluna RTX-5; ^bIK-Índice de Kovats calculado em coluna RTX-1; M-macho; (+) presença no inseto.

4.3.2 Bioensaios eletroantenográficos

Os bioensaios eletroantenográficos (“puff”) foram utilizados com objetivo de avaliar a resposta dos insetos aos seus próprios extratos, e ao do sexo oposto, visando com esse teste, a indicação do tipo de feromônio. Os resultados dos bioensaios eletroantenográficos realizados com os extratos de machos e fêmeas sobre as antenas de ambos os sexos de *O. invirae*, demonstraram que as antenas das fêmeas apresentaram respostas significativas ($p < 0,05$) aos extratos cuticulares e voláteis dos machos. Não havendo, entretanto, diferença nas respostas aos estímulos das amostras de fêmeas, nem ao hexano (controle).

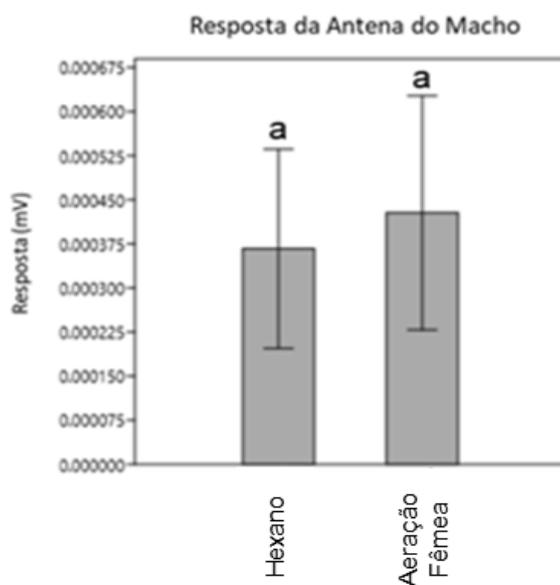
Para as antenas dos machos não houve diferença entre as respostas ao hexano e às amostras dos extratos cuticulares do macho (Anova com $p = 0,63$) (Figura 53), e entre hexano e os voláteis das fêmeas (Anova com $p = 0,205$) (Figura 54).

Figura 53 - Média e desvio padrão das respostas eletroantenográficas das antenas dos machos de *Opsiphanes invirae* aos extratos do macho (asa posterior e abdome) e hexano (controle)



*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

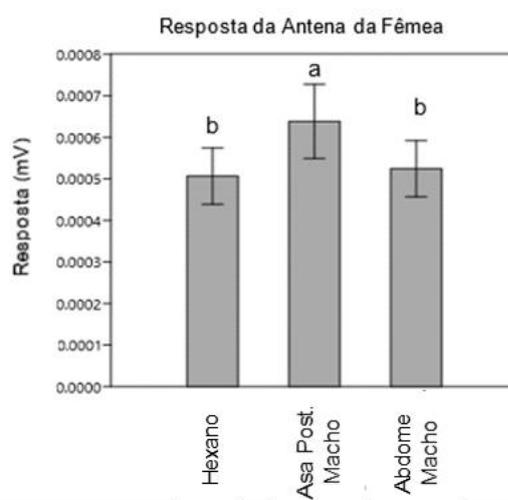
Figura 54 - Média e desvio padrão das respostas eletroantenográficas das antenas dos machos de *Opsiphanes invirae* aos voláteis das fêmeas e hexano (controle)



*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

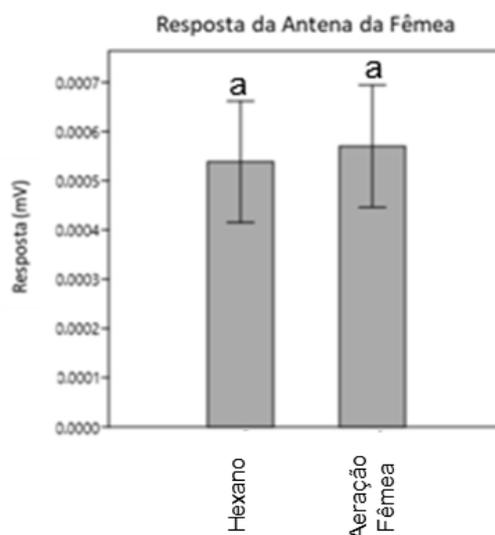
A figura 55 mostra a resposta significativa ($p = 0,003$) da antena da fêmea ao estímulo da asa posterior de macho, não havendo diferença ($p=0,873$) ao extrato do abdome do macho. O gráfico da figura 56 revela que não houve diferença significativa (Anova com $p=0,45$) entre as respostas das antenas da fêmea ao hexano e às amostras dos voláteis das próprias fêmeas.

Figura 55 - Média e desvio padrão das respostas eletroantenográficas das antenas das fêmeas de *Opsiphanes invirae* aos extratos do macho (asa posterior e abdome) e hexano (controle).



*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

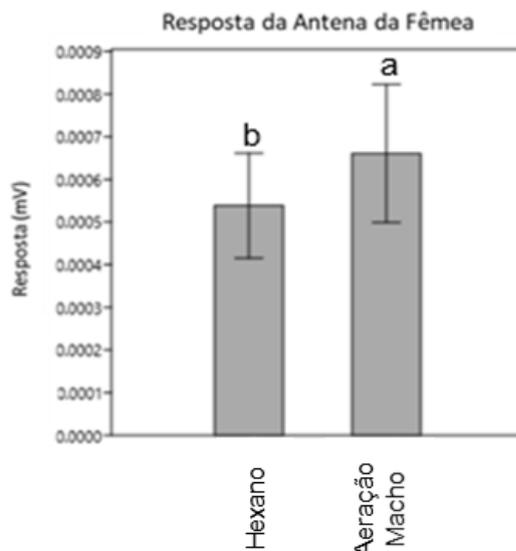
Figura 56 - Média e desvio padrão das respostas eletroantenográficas das antenas das fêmeas de *Opsiphanes invirae* aos voláteis das fêmeas e hexano (controle)



*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

As antenas das fêmeas também responderam de forma significativa as amostras de aeração dos machos ($p= 0,027$). Indicando, portanto, a presença de compostos biologicamente ativos no macho (Figura 57).

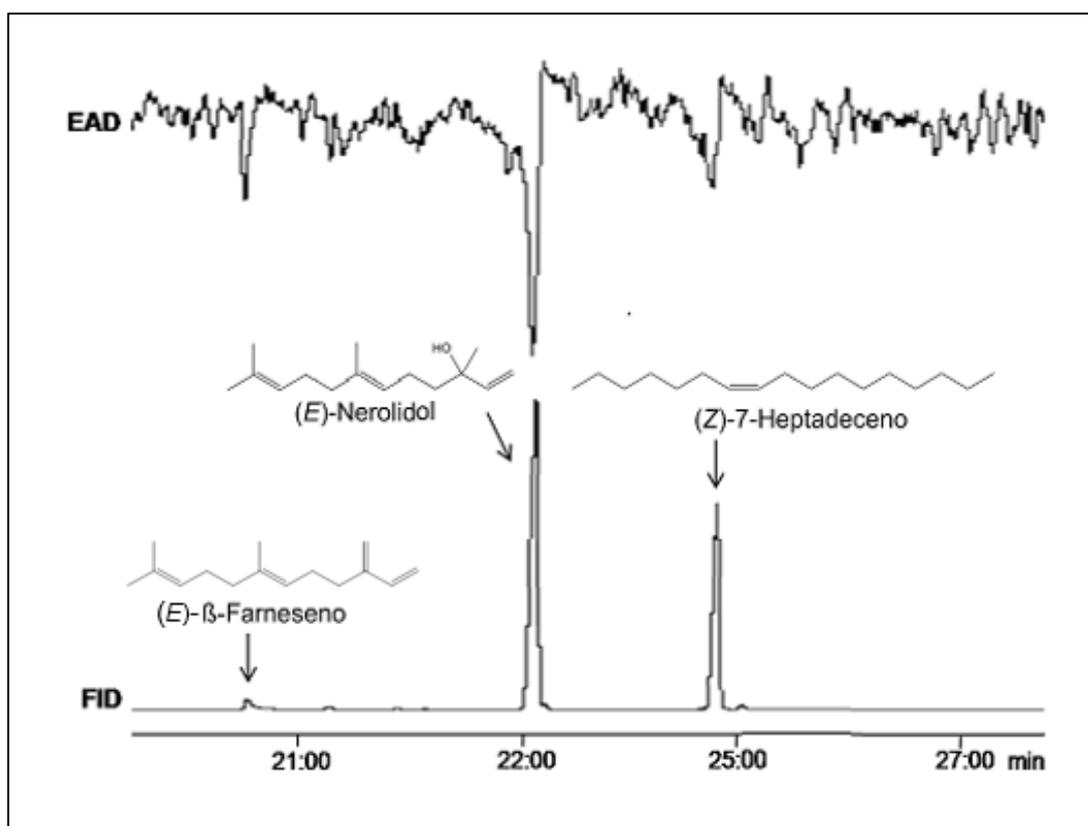
Figura 57 - Média e desvio padrão das respostas eletroantenográficas das antenas das fêmeas de *Opsiphanes invirae* aos voláteis de aeração dos machos e controle (hexano)



*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

As análises do CG-EAG, revelaram que nas amostras da asa posterior do macho, três compostos provocaram a despolarização nas antenas das fêmeas, sendo estes: (*E*)- β -Farneseno, (*E*)-nerolidol e (*Z*)-7-heptadeceno. Dentre tais compostos, as antenas das fêmeas apresentaram respostas mais expressivas ao composto (*E*)-nerolidol. Os compostos bioativos para a fêmea foram destacados no cromatograma de acordo com a ordem de eluição (Figura 58). Os resultados das análises do (CG-EAG), comprova, portanto, a bioatividade dos compostos macho-específico para a antena da fêmea de *O. invirae*.

Figura 58 - Cromatograma (GC-FID) do extrato da asa posterior do macho de *Opsiphanes invirae* e a resposta eletroantenográfica (GC-EAD) da antena da fêmea coespecífica. As setas indicam os compostos para os quais houve despolarização da antena



4.3. 3 Avaliação da atividade biológica dos compostos de *Opsiphanes invirae* em condições de campo

Com os resultados dos bioensaios eletroantenográficos obtidos em laboratório e das análises químicas obtivemos indícios de que os compostos macho-específico estudados poderiam se tratar dos componentes feromonais desta espécie.

A avaliação foi realizada em área com foco da praga, exatamente no início do período de emergência dos adultos de *O. invirae*, visando a observação do comportamento de atração dos insetos frente às misturas. Foi avaliada a atratividade das três misturas sintéticas de feromônio em campo. A primeira mistura consistia dos compostos bioativos (*E*)- β -farneseno, (*E*)-nerolidol, e (*Z*)-7-heptadeceno) revelados nos ensaios eletroantenográficos em laboratório, no qual as antenas das fêmeas responderam de forma significativa aos extratos dos machos. Na segunda mistura, testamos a hipótese de melhoria da mistura feromonal com os compostos

bioativos no EAG (*E*- β -farneseno, (*E*)-nerolidol, e (*Z*)-7-heptadeceno), e adição do componente (*E*)- β -ocimeno. Esta hipótese se justifica pelo fato do (*E*)- β -ocimeno ser o único composto presente nos extratos analisados de machos e fêmeas, e pelas múltiplas funções relatadas na literatura. Na terceira mistura, verificamos a hipótese da retirada de um dos compostos bioativos no EAG, no intuito de verificar a eficiência da formulação com apenas dois componentes (*E*- β -Farneseno e (*E*)-nerolidol). Essa hipótese se justifica pela expectativa das vantagens econômicas e produtivas com a ausência do componente sintetizado em laboratório, (*Z*)-7-heptadeceno. Dessa forma, os tratamentos T1, T2 e T3 consistiam além do atraente alimentar, das misturas um, dois e três, respectivamente. O controle, não possuía mistura, somente atrativo alimentar.

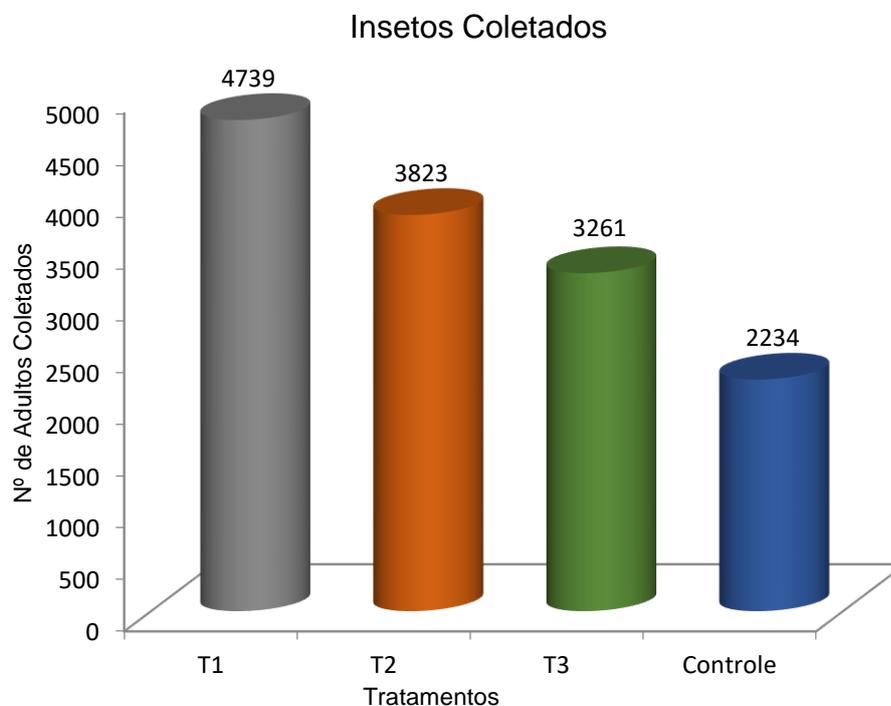
Conforme os resultados oriundos dos testes em laboratório, o efeito esperado da introdução dos tratamentos no campo era de que a atratividade das misturas somadas ao atrativo alimentar, fosse superior ao resultado isolado apenas com o atrativo alimentar. Esperava-se a atração das fêmeas maduras sexualmente e, por consequência, a de machos, uma vez que, a presença de fêmeas juntamente com o atrativo alimentar no período reprodutivo dos insetos, aumenta a atratividade do sexo oposto, visto se tratar de variáveis mais atraentes que o do atrativo alimentar isolado.

Conforme as referências bibliográficas, os machos de borboletas emergem primeiro que fêmeas como estratégia para alcançar seu sucesso reprodutivo máximo (FAGERSTROM; WIKLUND, 1982; KUMARA et al., 2015; ZONNEVELD, 1992). Assim, o número de machos capturados no início do monitoramento foi maior, atingindo a maturidade sexual antes das fêmeas. Os testes de atratividade em campo se comportaram conforme o esperado, mostrando que a ação dos tratamentos foi significativamente superior ao controle.

Durante todo o período de avaliação (cinco monitoramentos) foram coletados 14.057 insetos adultos, dos quais 33,71%, 27,20% e 23,20% correspondem aos tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente, versus 15,89% dos insetos capturados no tratamento T4 (controle) (Figura 59).

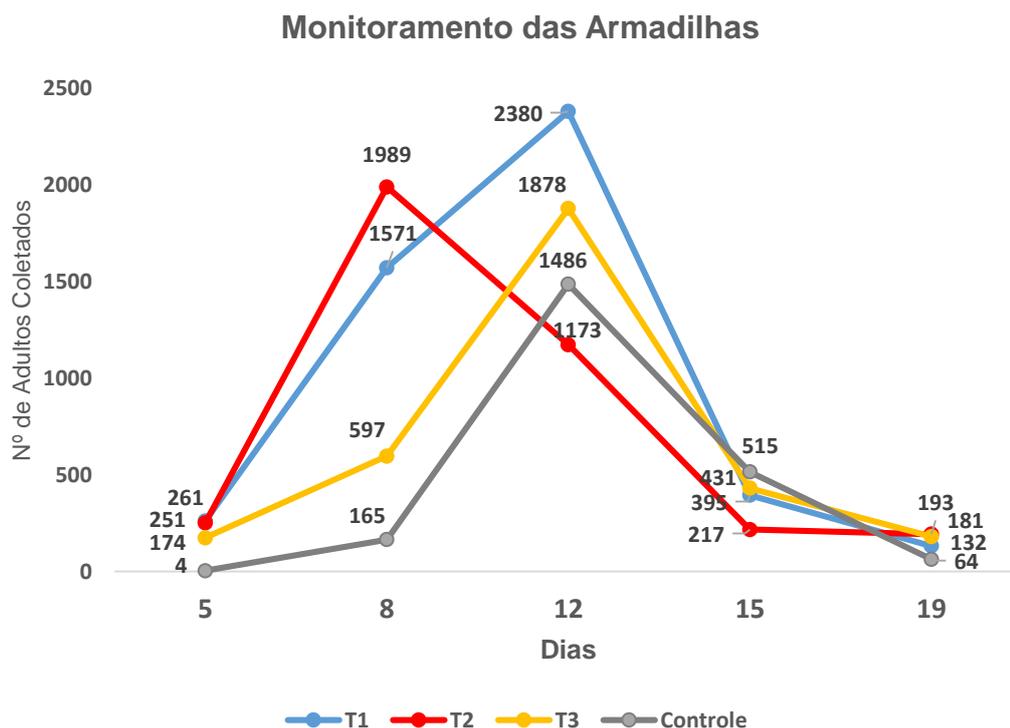
Figura 59 – Número de espécimes adultos de *Opsiphanes invirae* capturados nas armadilhas iscadas com mistura de feromônios em campo, versus controle. T1- (*E*- β -Farneseno, (*E*)-nerolidol e (*Z*)-7-heptadeceno); T2- (*E*- β -

ocimeno, (*E*)- β -Farneseno, (*E*)-nerolidol, e (*Z*)-7-heptadeceno; T3- (*E*)- β -Farneseno e (*E*)-nerolidol



O número de insetos coletados por monitoramento para cada tratamento, nos mostra claramente o início do período de emergência de *O. invirae* em campo no primeiro monitoramento (5º dia), o pico populacional no terceiro monitoramentos (12º dia) e a brusca redução da população, no quarto e quinto monitoramentos (15º e 19º dia, respectivamente) (Figura 60).

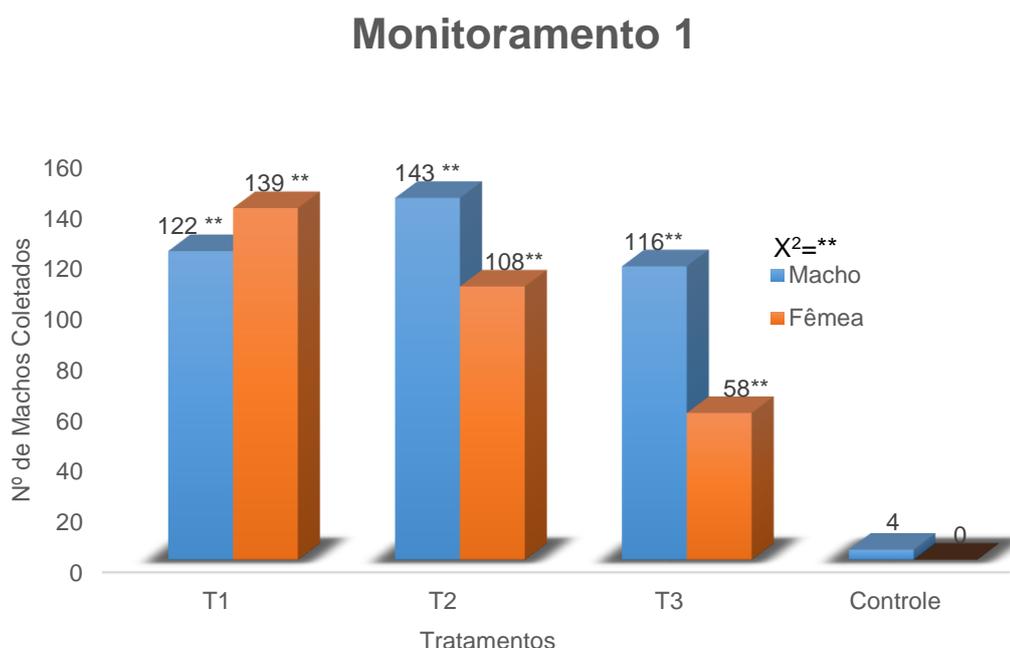
Figura 60 - Número de insetos adultos de *Opsiphanes invirae* capturados durante o monitoramento nas armadilhas iscadas com misturas de feromônio em campo, versus controle



Fica claro o declínio na atratividade das armadilhas iscadas após o terceiro monitoramento (12º dia). Este fato coincidiu com o previsto para a duração da população de insetos adultos em campo (observação pessoal). Portanto, neste caso, necessita-se verificar a estabilidade das moléculas e influência do liberador do feromônio, para melhor compreensão da durabilidade do produto em campo. Contudo, aparentemente a dosagem (5mg) utilizada no experimento mostrou-se ser eficaz para atratividade de *O. invirae*. A partir das observações ao longo do tempo é possível perceber que o tratamento T2 apresenta uma queda acentuada após o segundo monitoramento (8 dias). O tratamento T2 é o único tratamento com a presença do componente (*E*)- β -ocimeno, sugerindo que este composto por apresentar alta volatilidade, conforme os cromatogramas dos voláteis de aeração (ver Figura 35), possa ser o responsável por esta instabilidade em campo, mostrando perda precoce de atratividade.

No primeiro monitoramento (cinco dias após a instalação das armadilhas), todas as armadilhas contendo feromônio (T1, T2 e T3), foram significativamente diferente do controle, tanto para machos como para fêmeas (Figura 61). Uma análise secundária mostra que não houve diferença entre os sexos, ou seja, a quantidade de machos e fêmeas é estatisticamente similar.

Figura 61 - Número de insetos adultos machos e fêmeas de *Opsiphanes invirae* capturados nas armadilhas iscadas com misturas de feromônio em campo, versus controle, no primeiro monitoramento. T1- (*E*)- β -Farneseno, (*E*)-nerolidol e (*Z*)-7-heptadeceno; T2- (*E*)- β -ocimeno, (*E*)- β -Farneseno, (*E*)-nerolidol, e (*Z*)-7-heptadeceno; T3- (*E*)- β -Farneseno e (*E*)-nerolidol

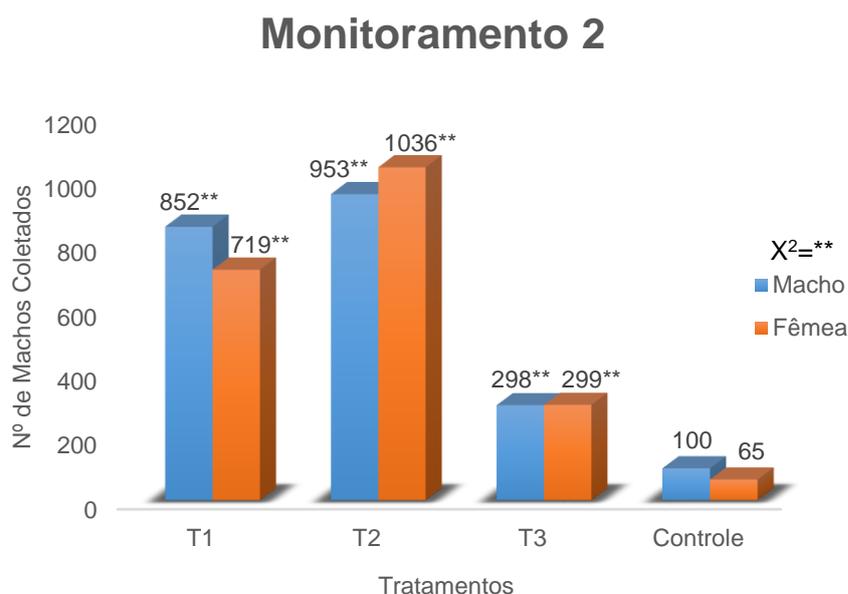


X²= Teste do Qui-quadrado; ** Significância a 1% de probabilidade ($\geq 11,35$).

Ressalta-se que a quantidade de insetos no controle foi mínima, de apenas quatro exemplares machos, frente a um total de 690 insetos coletados nos tratamentos com feromônio. Este fato deve ser considerado, devido o comportamento sexual desta espécie, onde os insetos adultos já se encontram sexualmente maduros desde seu segundo dia de vida (ver capítulo 1). Assim, conclui-se que, conforme já exposto, o feromônio atraiu as fêmeas e machos sexualmente ativos para os tratamentos.

No segundo monitoramento (oito dias após a instalação das armadilhas), as misturas T1, T2 e T3 mostraram diferença significativa em relação ao controle. Novamente é evidenciado que os tratamentos foram efetivos, com alto grau de significância em relação ao controle. Observa-se no gráfico que a proporção de indivíduos machos e fêmeas se mantém (Figura 62), o que reforça as conclusões expostas no monitoramento 1, pois mantém as mesmas características para uma população maior de insetos, com total de 4.322 indivíduos.

Figura 62 - Número de insetos adultos machos e fêmeas de *Opsiphanes invirae* capturados nas armadilhas iscadas com misturas de feromônio em campo, versus controle, no segundo monitoramento. T1- (*E*)- β -Farneseno, (*E*)-nerolidol e (*Z*)-7-heptadeceno); T2- (*E*)- β -ocimeno, (*E*)- β -Farneseno, (*E*)-nerolidol, e (*Z*)-7-heptadeceno; T3- (*E*)- β -Farneseno e (*E*)-nerolidol



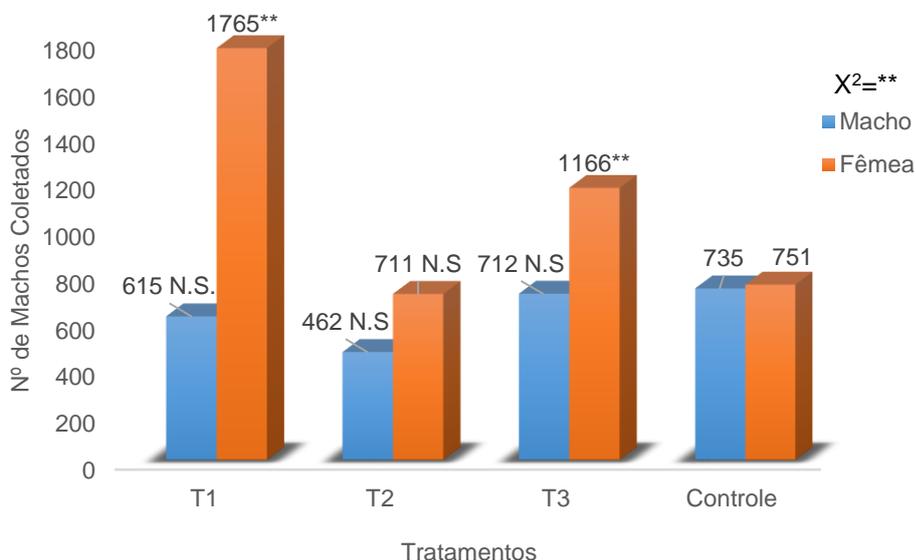
X²= Teste do Qui-quadrado; ** Significância a 1% de probabilidade ($\geq 11,35$).

No terceiro monitoramento (12 dias após a instalação das armadilhas) foi obtido o maior número de insetos capturados, com um total de 6.917 exemplares. Neste monitoramento vemos uma notória diferença em relação aos demais. O número de fêmeas atraídas permanece superior ao controle (Figura 63), contudo o número de machos não apresenta grau de significância em relação ao controle. Ou seja, em todos os tratamentos percebe-se um número maior de fêmeas em relação aos machos, exceto no controle, que apresenta um número muito próximo entre macho e fêmeas. Neste sentido, voltamos a ressaltar que o resultado esperado para o feromônio é que seja atrativo para os insetos maduros sexualmente. Notando-se, portanto, um número superior de fêmeas ativas sexualmente em relação aos machos.

Figura 63 - Número de insetos adultos machos e fêmeas de *Opsiphanes invirae* capturados nas armadilhas iscadas com misturas de feromônio em campo, versus controle, no terceiro monitoramento. T1- (*E*)- β -Farneseno, (*E*)-nerolidol

e (**Z**)-7-heptadeceno); T2- (*E*)- β -ocimeno, (*E*)- β -Farneseno, (*E*)-nerolidol, e (**Z**)-7-heptadeceno; T3- (*E*)- β -Farneseno e (*E*)-nerolidol

Monitoramento 3

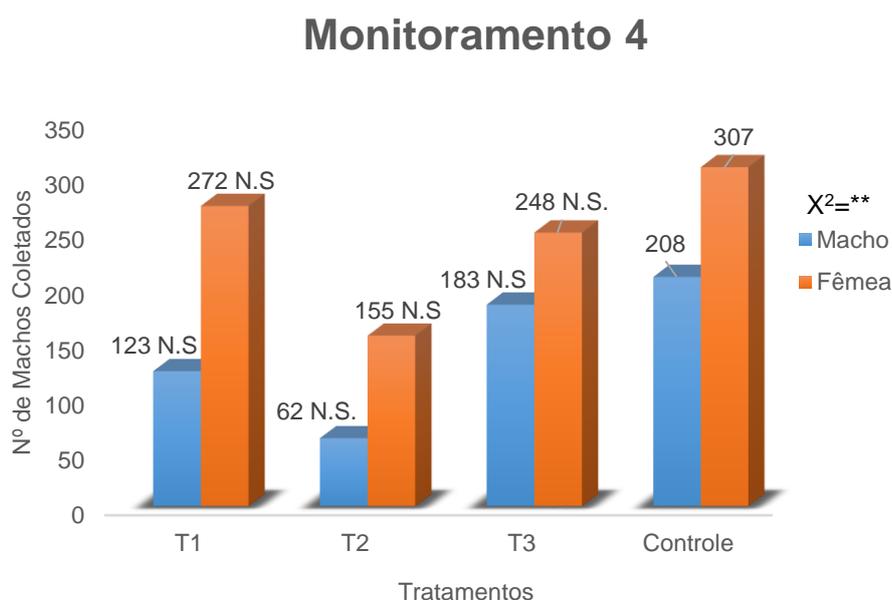


X²= Teste do Qui-quadrado; ** Significância a 1% de probabilidade ($\geq 11,35$).

Observa-se que o número de machos no terceiro monitoramento foi menor em todos os tratamentos, não apresentando diferença em relação ao controle. Ao passo que o número de fêmeas foi muito superior. Levando em consideração que os machos atingem a maturidade sexual antes das fêmeas, podemos concluir que o número de machos ativos sexualmente já não é significativo no terceiro monitoramento, mesmo havendo fêmeas ativas. Assim, o resultado mostra que o feromônio continua eficaz, atraindo muito mais fêmeas que o controle, mas que os machos já não estão mais sendo atraídos em virtude de ter passado a fase sexualmente ativa, e, portanto, estão sendo atraídos apenas pelo atrativo alimentar, o que justifica não haver significância entre o número de exemplares machos capturados nos tratamentos e o controle. Este fato será reforçado pela análise do monitoramento seguinte, que demonstrará que as fêmeas também não estarão mais ativas sexualmente no próximo monitoramento, casando perfeitamente com a precocidade do macho encerrar a atividade sexual antes, para em seguida, a fêmea também passar pelo mesmo fenômeno.

No quarto monitoramento (15 dias após a instalação das armadilhas) foi observada uma queda substancial do total de insetos, totalizando 1.558 indivíduos (Figura 64). Nesse monitoramento não houve significância entre o número de insetos capturados nos tratamentos em relação ao controle. Assim, é possível levantar duas hipóteses: ou os insetos já não estão mais ativos sexualmente, ou o feromônio perdeu sua efetividade.

Figura 64 - Número de insetos adultos machos e fêmeas de *Opsiphanes invirae* capturados nas armadilhas iscadas com mistura de feromônio em campo, versus controle, no quarto monitoramento. T1- (*E*)- β -Farneseno, (*E*)-nerolidol e (*Z*)-7-heptadeceno); T2- (*E*)- β -ocimeno, (*E*)- β -Farneseno, (*E*)-nerolidol, e (*Z*)-7-heptadeceno; T3- (*E*)- β -Farneseno e (*E*)-nerolidol



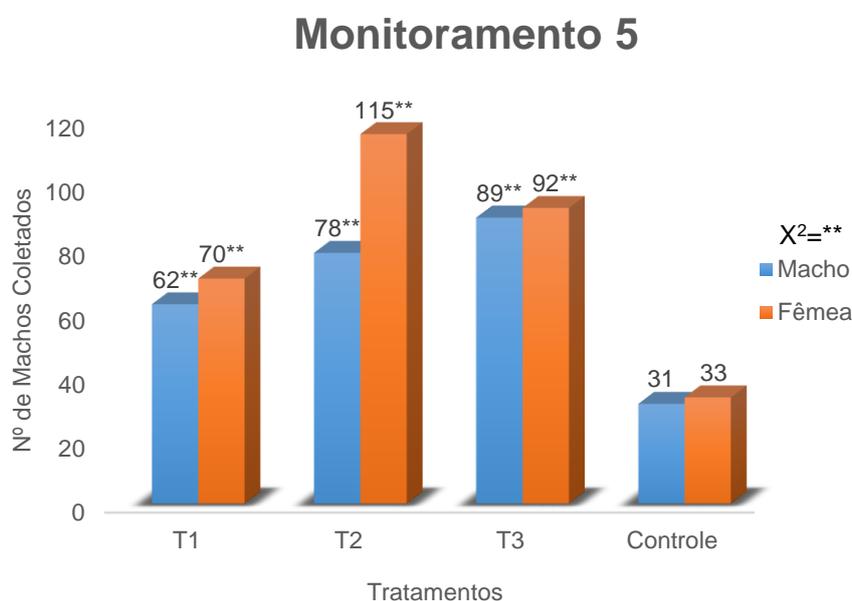
χ^2 = Teste do Qui-quadrado; ** Significância a 1% de probabilidade ($\geq 11,35$).

Conforme será visto no resultado do próximo monitoramento, conclui-se que a primeira hipótese é verdadeira. Pela análise do terceiro monitoramento, ficou claro que os tratamentos continuaram a ter o efeito esperado, de atração das fêmeas, e que a diminuição de captura dos machos, embora houvesse fêmeas, decorre de o estágio de maturação sexual dos machos já ter se passado. No quarto monitoramento, ratificamos que essa característica se mantém para os machos, e verificamos que, conforme esperado, as fêmeas atingiram a maturidade sexual um pouco depois. Assim, notamos que no referido monitoramento, já não há também

atratividade do feromônio para as fêmeas, não havendo significância em relação ao controle, já que o número de insetos, machos e fêmeas, capturados no controle foi maior que nos demais tratamentos, confirmando que a atratividade é somente alimentar.

No quinto monitoramento (19 dias após a instalação das armadilhas), observamos um número bem inferior de insetos, totalizando 570 indivíduos. Nossa hipótese é que estes são os insetos que tiveram emergência tardia, e, assim, ficaram fora do ciclo dos demais. O número de insetos capturados nos tratamentos T1, T2 e T3 foi significativo em relação ao controle (Figura 65). Dessa forma, pode-se observar que novamente há insetos ativos sexualmente, embora para um número total reduzido. Assim, verifica-se apenas que houve defasagem do ciclo de vida destes poucos insetos em relação aos demais, mas conclui-se que os tratamentos continuam eficazes.

Figura 65 - Número de insetos adultos machos e fêmeas de *Opsiphanes invirae* capturados nas armadilhas iscadas com misturas de feromônio em campo, versus controle, no quinto monitoramento



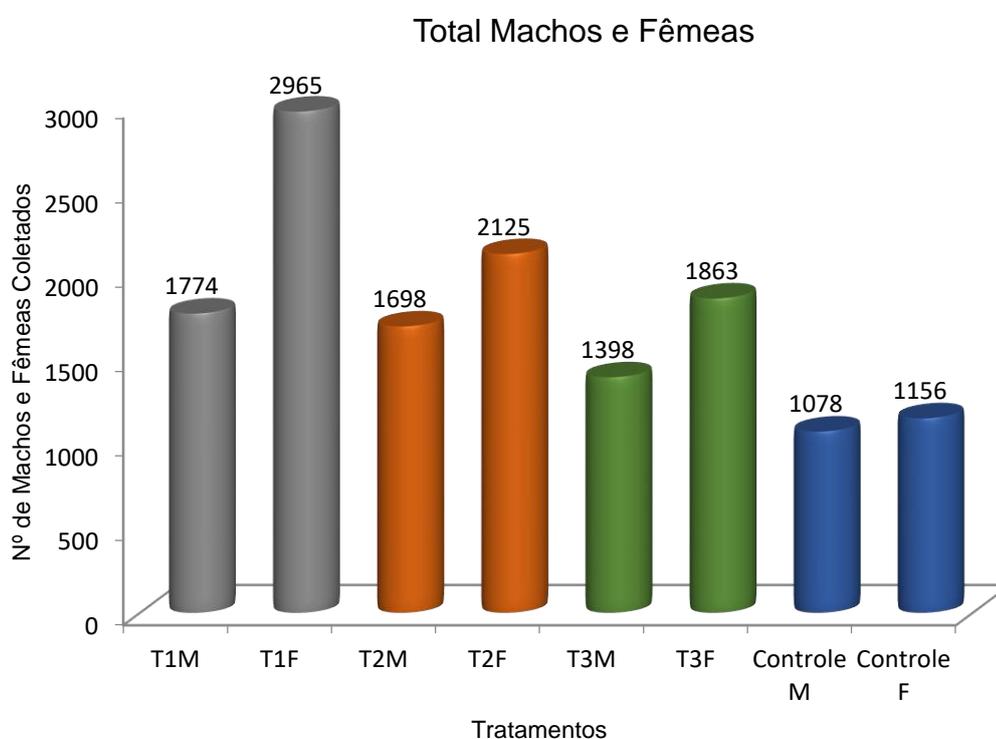
X²= Teste do Qui-quadrado; ** Significância a 1% de probabilidade ($\geq 11,35$).

Esses retificam a conclusão do quarto monitoramento, de que o feromônio não teve atratividade em virtude de não haver mais número suficiente de indivíduos sexualmente ativos. Portanto, ao avaliar todos os monitoramentos, é conclusivo que

houve efetividade dos tratamentos na atração dos insetos, e que as diferenças observadas entre monitoramentos são inerentes ao ciclo de vida dos insetos, demonstrando que o feromônio tem atuação do primeiro ao último monitoramento.

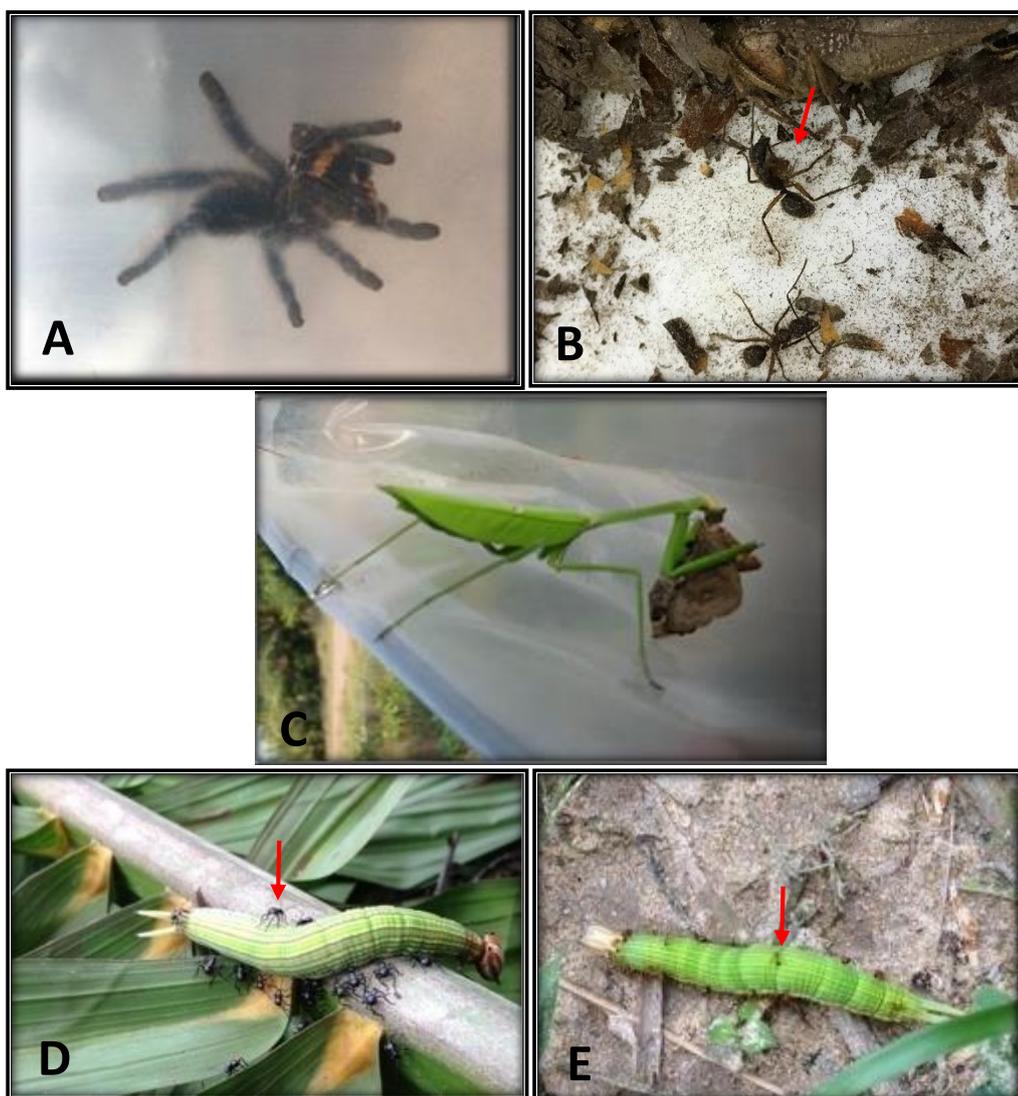
No geral, foram capturados 8.109 fêmeas e 5.948 machos em todos os tratamentos, observando que o número de fêmeas capturadas foi superior aos dos machos (Figura 66).

Figura 66 - Número de espécimes adultos de *O. invirae* capturados nas armadilhas iscadas com mistura de feromônios em campo, versus controle



Nas armadilhas tratadas com adição do feromônio sintético observamos a presença de alguns inimigos naturais, como formigas e aranhas, predando os adultos capturados, e lova-a-deus em armadilha somente com melão (Figuras 67A, 67B e 67C). Também foi observado a predação das lagartas de *O. invirae* por *Alcaeorrhynchus grandis* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae) e formigas (Figuras 64D e 64E).

Figura 67 – Insetos predadores de adultos e lagartas de *O. invirae*



Fonte: Autora, 2018.

LEGENDA:

A) aranha;

B) formigas predando adultos;

C) louva-a-deus;

D) percevejo *Alcaeorrhynchus grandis*;

E) formigas predando lagartas

O ocimeno é um monoterpeneo, conhecido por ser constituinte comum de odores florais que atraem insetos, incluindo os inimigos naturais ou polinizadores (DUDAREVA et al., 2003; TANG; ZHANG; ZHANG, 2016). É um composto, bastante comum na mistura volátil emitida por plantas em resposta a herbivoria e danos mecânicos (BORGES et al., 2018; PARE; TUMLINSON, 1999). Em plantas de erva mate, *Ilex Paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae), (*E*)- β -ocimene teria função específica de defesa contra insetos herbívoros e microorganismos (MARTINS et al.,

2017). E em colônia de abelhas, (*E*)- β -ocimene atua como feromônio de ninhada envolvido na regulação social (GILLEY et al., 2006; MAISONNASSE et al., 2010).

Em borboletas, compostos químicos são comumente capturados de plantas para produção de sinais voláteis (BORGES et al., 2018; BOPPRÉ, 1984; TRIGO et al., 1996). Como exemplo, alguns machos de lepidópteros da família Nymphalidae, subfamílias Danainae e Ithominae, e as mariposas da família Noctuidae e subfamília Arctinae, armazenam substâncias das plantas para defesa contra predadores, sendo estes ainda, utilizados como precursores de feromônios sexuais em machos (TRIGO; BARATA; BROWN, 1994; SCHULZ et al., 2004). Em *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae), o composto (*E*)- β -Ocimene, é sugerido como composto sequestrado de *Passiflora edulis* (Passifloraceae), por lagartas desta borboleta para compor o buquê odorífero das glândulas aromáticas abdominais de machos adultos (BORGES et al., 2018). Já em *H. melpomene*, (*E*)- β -Ocimene, é relatado como um feromônio anti-afrodisíaco, onde os machos liberam este composto de seus órgãos genitais, que poderia servir como reconhecimento de machos, assim as fêmeas acasaladas receberiam este odor, ficando pouco atraentes, por cheirar como machos (SCHULZ et al., 2008). Farré-Armengol e colaboradores (2017) destacam a importância do β -ocimeno no estabelecimento de interações biológicas muito relevantes entre plantas e organismos benéficos. Na mariposa *Hyphantria cunea* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Erebidae), β -ocimeno é descrito como sinergista em compostos feromônicos sexuais para atração das mariposas machos desta espécie (TANG; ZHANG; ZHANG, 2016, 2012).

Como descrito anteriormente, embora o composto ocimene não tenha apresentado bioatividade nos ensaios eletroantegráficos, este componente foi avaliado em campo devido as diversas funções relatadas na literatura, na expectativa de melhoria da atratividade do feromônio. No entanto, os resultados revelam que não houve diferença entre os tratamentos T1 e T2, não se mostrando vantajoso o acréscimo do β -ocimeno na mistura feromonal de *O. invirae*. Além disso, a adição deste composto parece ser responsável pela perda precoce de atratividade do tratamento T2 em campo.

(*E*)- β -Farnesene é um semioquímico amplamente utilizado por plantas e insetos para comunicação (CROCK; WILDUNG; CROTEAU, 1997). Este composto pode ser liberado pelos insetos atuando como feromônio e alomônios, e em alguns insetos predadores, como caimônio para localização de suas presas (BORGES et

al., 2018; PARE; TUMLINSON, 1999). Na subfamília Danainae, (*E*)- β -Farneseno foi identificado no pincel de pêlos dos extratos de machos da borboleta monarca (SCHULZ; BOPPRE; VANE-WRIGHT, 1993), e relatado como feromônio sexual nos machos da mariposa *Corcyra cephalonica* (Stainton, 1865) (Lepidoptera: Pyralidae), onde os extratos obtidos da asa ou composto sintético mostraram-se atraentes para as fêmeas agindo à curta distância (SARTO MONTEYS et al., 2012; ZAGATTI et al., 1987). Em campo (*E*)-beta-farneseno mostrou-se como principal constituinte atraente para a captura de machos da mariposa de *Cydia pomonella* (L., 1758) (Lepidoptera: Tortricidae) (CORACINI et al., 2004). Recentemente o composto (*E,E*)- α -farneseno, foi identificado como sexto componente do feromônio de agregação em uma população brasileira de machos de *Alphitobius diaperinus* (Panz, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). Dentre os constituintes do feromônio desta praga ainda estão (*E*) ocimene e (*S*) linalol, sendo este último, o constituinte principal (HASSEMER et al., 2016).

O nerolidol é um sesquiterpeno abundante em muitas espécies de plantas (THANH; CHAUHAN, 2014). Nos percevejos *Amblypelta lutescens lutescens* (Distant, 1911) e *Leptoglossus phyllopus* (L., 1767) (Hemiptera: Coreidae), as misturas de voláteis macho-específico liberados por estes, descrito como possível feromônio, destaca o Nerolidol como constituinte majoritário (ALDRICH et al., 1993; KHRIMIAN et al., 2012; THANH; CHAUHAN, 2014). Em *Nezara viridula* (L., 1758) (Hemiptera: Pentatomidae), nerolidol é relatado como um dos quatro constituintes da mistura feromonal produzido pelos machos (MIKLAS, 2000). Em *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), nerolidol provocou resposta nas antenas de fêmeas coespecíficas, como um composto induzido por hebevoira emitidos pelas plantas do milho (PINTO-ZEVALLOS; STRAPASSON; ZARBIN, 2016).

O composto 1-heptadeceno foi identificado como constituinte minoritário, sendo identificado como feromônio sexual macho-específico do besouro necrófago *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840) (Coleoptera: Silphidae) de interesse forense. Nesta espécie, é relatado que os machos são os responsáveis por buscar a fonte alimentar e então liberar os componentes feromonais para atração das fêmeas, que são atraídas somente pela combinação da fonte alimentar (extrato da carcaça) e voláteis de machos, caracterizando um sinergismo (FOCKINK; MISE; ZARBIN, 2013).

Dentre os compostos utilizados nas misturas em campo no presente trabalho, (*E*)- β -Farneseno, (*E*)-nerolidol e (*Z*)-7-heptadeceno, revelaram serem constituintes importantes do feromônio de agregação de *O. invirae*.

O comportamento dos insetos adultos nas armadilhas avaliadas neste estudo foi claramente intenso nos horários crepusculares matutinos e vespertinos. Nestes períodos, observamos uma grande movimentação de grupos de insetos concentrados na borda das armadilhas, em vôos contínuos e localizados. Embora *O. invirae* tenha hábito diurno, alimentando-se por todo o dia, este comportamento não foi observado no decorrer do dia durante as avaliações em campo, caracterizando esta movimentação, como comportamento sexual desta espécie.

Em borboletas, a escolha do parceiro é influenciada por sinais visuais e olfativos, importantes à curto alcance (ANDERSSON et al., 2007). Machos de muitas espécies competem por territórios realizando interações aéreas com objetivo de acasalamento (KEMP; WIKLUND, 2001; TAKEUCHI, 2017). Espécies do gênero Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae), por exemplo, possuem grande capacidade de agregações (PINHEIRO et al., 2008). Para Haber (1978), este comportamento gregário nos itomíneos são exhibições de acasalamento ou leks realizados pelos machos, envolvendo a liberação de feromônio. Como descrito por Hoglund e Alatalo (1995), leks são áreas de agregações de machos, onde fêmeas chegam apenas para o acasalamento. Em mosca-das-frutas do Caribe, *Anastrepha suspensa* (Loew, 1862) (Diptera: Tephritidae), machos formam leks e atraem fêmeas com a liberação de feromônio (NATION, 1990). Estes padrões de acasalamento em lek, também foram relatados nas borboletas crepusculares *Caligo illioneus* (Cr., 1775) e *Caligo oileus* Felder, 1861 (Lepidoptera: Nymphalidae) (SRYGLEY; PENZ, 1999).

Sobre o comportamento sexual de *O. invirae*, sabe-se que machos realizam exhibições aéreas em seu comportamento reprodutivo, liberando feromônio afrodisíaco para atração de fêmeas para acasalamento (ver capítulo 1). De acordo com Srygley e Penz (1999), as características ambientais que são procuradas pelas fêmeas, aumentam as chances de encontrar uma fêmea em tal localidade, sendo este fato, determinante para a localização das arenas dos machos. Nossa hipótese é que os sinais químicos (feromônio e alimento) e os indicativos visuais da população de insetos, em condições de acasalamento, somam elementos que levaram os insetos adultos machos e fêmeas a se dirigirem preferencialmente às armadilhas

iscadas com feromônio. Inicialmente as fêmeas são atraídas pelo feromônio sexual do macho e atrativo alimentar, e posteriormente, os machos, fazendo uso dos sinais químicos e visuais, se direcionam em busca de fêmeas para o acasalamento.

Nesta avaliação fizemos uso da técnica de captura massal dos insetos para o controle da população de *O. invirae*. O conceito desta técnica faz uso iscas químicas sintéticas espécie-específicas, como feromônios sexuais e de agregação, e atrativos alimentares ou do hospedeiro, para atração dos insetos à uma armadilha, onde estes ficam presos e morrem. Nesta técnica, a densidade e a eficiência das armadilhas, bem como a eficiência das iscas, necessitam ser suficientes para uma captura expressiva de insetos, visando a redução dos danos econômicos (EL-SAYED et al., 2006). Realçar o odor do hospedeiro ou o sinergismo da atração sexual é de grande importância no desenvolvimento de iscas à base de feromônio (LANDOLT; PHILLIPS, 1997).

Em ambientes naturais muitos dos odores biologicamente ativos dos insetos, são emitidos a partir da sinalização de alimentos e plantas. Nesta situação, iscas que são produzidas exclusivamente com feromônio, não são suscetíveis de serem competitivas quando colocadas em campo. Os feromônios de insetos machos em geral, além de indicar a localização de um recurso alimentar, sinaliza a possível presença de fêmeas na área (CERUTI, 2007; LANDOLT; PHILLIPS, 1997).

Um exemplo de isca de machos de sucesso levando em consideração estes fatores, é o feromônio de agregação da broca-do-olho do coqueiro, *Rhynchophorus palmarum* L. 1764 (Coleoptera: Curculionidae), o Rincoforol, que associa a captura destes insetos ao atraente alimentar como a cana-de-açúcar, apresentando excelentes resultados na captura massal desta praga em cultivos de arecáceas (NAVARRO et al., 2002; WITZGALL; KIRSCH; CORK, 2010). No besouro *Carpophilus lugubris* Murray, 1864 (Coleoptera: Nitidulidae), a adição do feromônio de agregação ao atraente alimentar, provocou um aumento significativo em sua atração (HENGCHEN; LARRY, 1992). Em *O. discicolle*, esse comportamento se repetiu, demonstrando que a combinação de voláteis de machos, na presença de odor alimentar eram atraentes para as fêmeas.

Além dos coleópteros, muitas espécies de drosofilídeos são atraídas para o feromônio dos machos em associação com odores alimentares (LANDOLT; PHILLIPS, 1997). Recentemente, em estudo com *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera: Drosophilidae), foi demonstrado que o feromônio sexual produzido

por machos desta espécie, na presença do odor alimentar, provocou nas moscas maior rapidez na receptividade das fêmeas virgens, ao cortejo de machos (DAS et al., 2017). Em *H. cunea*, foi relatado a influência dos voláteis das folhas na captura dos adultos, quando adicionadas em armadilhas de feromônio sexual, afetando os comportamentos de reprodução, com o aumento das taxas de acasalamento e oviposição (TANG; ZHANG; ZHANG, 2016).

Em lepidópteros, a técnica de captura massal com iscas de feromônio tem sido usada para o controle das mariposas *C. pomonella* e *Pectinophora gossypiella* (Saund., 1844) (Lepidoptera: Gelechiidae). Em *C. pomonella*, táticas de controle tem sido investigada com uso combinado do feromônio e caimônio para melhoria da isca feromonal no controle massal (EL-SAYED et al., 2006; KNIGHT et al., 2001; LIGHT et al., 2001; MAFRA-NETO; HABIB, 1996).

Os adultos de *Opsiphanes cassina* Stichel, 1902 (Lepidoptera: Nymphalidae), apresentam quimiotropismo positivo por substâncias orgânicas em decomposição, como frutas em fermentação (LÓRIA et al., 2002; PARRA et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2009; TINÓCO, 2016). Assim como *O. cassina*, atualmente, o manejo dos adultos de *O. invirae* ocorre com uso de armadilhas com atraente alimentar (melaço) para captura massal, e em alguns casos com uso de inseticida para uso da técnica atrai e mata. Os nossos resultados iniciais sugerem que as misturas do feromônio de *O. invirae* podem ser útil na potencialização da atratividade destes insetos, em função da maximização da captura de machos e fêmeas, através da técnica de coleta massal.

Como observado em campo, o uso de armadilhas iscadas com feromônio sintético e atraente alimentar permitiu uma grande captura de insetos-alvo no seu período reprodutivo. E como resultado prático, esperamos que ocorra a interrupção no acasalamento, impedindo a oviposição em campo, e conseqüentemente, a redução da próxima geração do inseto-praga. Ficou claro que as armadilhas com feromônio e atraente alimentar foi significativamente mais atraente que as armadilhas apenas com o alimento. A presente mistura contribuiu de forma expressiva ao método já aplicado, pela presença de componentes ativos sobre a atração dos insetos por todo o seu período reprodutivo, possibilitando, assim, uma contribuição efetiva ao controle de *O. invirae*.

Deste modo este produto potencializa a atratividade das armadilhas já usadas em campo, com adição do feromônio para o monitoramento e controle massal desta

praga. Estes resultados contribuem para a compreensão da ecologia química de *O. invirae* e evidencia o potencial deste feromônio como uma nova ferramenta que atenda aos preceitos do Manejo Integrado de Praga (MIP). No entanto, pesquisas futuras se fazem necessárias para o melhor entendimento da aplicação deste produto em campo, como por exemplo, investigação da duração e estabilidade do feromônio em diferentes liberadores e doses, em laboratório e campo.

5 CONCLUSÕES

A comunicação entre *O. invirae* é mediada por feromônio de agregação.

As análises dos voláteis e dos extratos hexânicos obtidos de machos e fêmeas mostraram a existência de compostos macho-específico. Identificamos que os machos desta espécie liberam naturalmente uma mistura de monoterpenos, sesquiterpenos e alcenos caracterizados como (*E*)- β -ocimeno, linalol, (*E*)- β -Farneseno, (*E*)-nerolidol, (*Z*)-7-hexadeceno e (*Z*)-7-heptadeceno. Destes compostos, apenas o (*E*)- β -ocimeno, é comum as fêmeas.

Nas análises eletrofisiológicas, os compostos macho-específico (*E*)- β -farneseno, (*E*)-nerolidol e (*Z*)-7-heptadeceno eliciaram respostas em fêmeas virgens, indicando se tratar dos constituintes do feromônio desta espécie.

Na avaliação de atratividade em campo, os constituintes do proposto feromônio de agregação de *O. invirae*, demonstraram incrementar a captura dos adultos nas armadilhas com atraente alimentar, contribuindo para maior atratividade.

Este estudo mostra-se efetivo, podendo subsidiar o uso de semioquímicos no MIP. Além disso, é um trabalho inédito, não havendo relatos na literatura voltados para o estudo do feromônio de *O. invirae*.

REFERÊNCIAS

AGELOPOULOS, N. et al. Exploiting semiochemicals in insect control. **Pesticide Science**, v. 55, p. 225-235, 1999.

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 07 maio 2018.

ALDRICH, J. R. et al. Male-specific volatiles from nearctic and Australasian true bugs (Heteroptera: Coreidae and Alydidae). *Journal of Chemical Ecology*, v. 19, n. 12, p. 2767–2781, 1993.

ALTSTEIN, M. Role of neuropeptides in sex pheromone production in moths **Peptides**, v. 25, pg. 1491–1501, 2004.

ANDERSON, P.; HALLBERG, E.; SUBCHEV, M. Morphology of antennal sensilla auricillica and their detection of plant volatiles in the Herald moth, *Scoliopteryx libatrix* L. (Lepidoptera : Noctuidae). **Arthropod Structure and Development**, v. 29, p. 33-41, 2000.

ANDERSSON, J. et al. Male sex pheromone release and female mate choice in a butterfly. **The Journal of experimental biology**, v. 210, p. 964-970, 2007.

AUSTIN, G. T. et al. A new species of *Opsiphanes* Doubleday, [1849] from western Mexico (Nymphalidae: Morphinae: Brassolini). **Bulletin of the Allyn Museum**, University of Florida, n. 150, 2007.

BALE, J. S. et al., Biological control and sustainable food production. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 27, v. 363, n.1492, p. 761–776, 2008.

BARCELOS, E. et al. **A cultura do dendê** /Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995.

BARTH, R. Bau und Funktion der Flügeldrü - sen einiger Mikrolepidopteren. Untersuchungen an den Pyraliden: *Aphomia gularis*, *Galleria mellonella*, *Plodia interpunctella*, *Ephestia elutella*, und *E. kuhniella*. **Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie**, v.150, pg. 1-3, 1937.

BARTH, R. Considerações gerais e específicas sobre as glândulas cutâneas sexuais dos lepidópteras. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75, n. 3-4, p. 129-140,1980.

BARTH, R. Das maennliche Duftorgan von *Erebus odoratus*. **Zool. Jb. (Anat.)**, v. 72, p. 289-301, 1952b.

BARTH, R. Die Hautdrüsen des Mannchens von *Opsiphanes invirae isagoras* Fruhst. (Lepidoptera, Brassolidae). **Zoologische Jahrbucher Anatomie**, v.72, pg. 216-230, 1952a.

BARTH, R. Os tubos abdominais dos machos de alguns Arctiidae e Ctnuchidae do Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 54, n. 3, p. 499-515, 1956.

BARTH, R. The male scent organ of the geometrid moth, *Sphacelodes vulneraria*. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 27, p.341-351, 1955.

BARTH, R. O órgão odorífero abdominal do macho de *Caligo arisbe* Hbn. (Lepidoptera, Brassolidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 51, p. 203-226, 1953.

BENTO, J. M. S.; PARRA, J. R. P.; DE MIRANDA, S. H. G.; ADAMI, A. C. O.; VILELA, E. F.; LEAL, W. S. How much is a pheromone worth? **F1000Research**, v. 5, p. 1763, 2016.

BENTO, J. M.S; VILELA, E. F.; PARRA, J. R. P.; LEAL, W. S. Monitoramento do bicho-furão-dos-citros com feromônio sexual: bases comportamentais para utilização dessa nova estratégia. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, n. 2, p. 351–366, 2001.

BOPPRE, M. Androconial systems in Danainae (Lepidoptera): functional morphology of *Amauris*, *Danaus*, *Tirumala* and *Euploea*, **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 97, p. 101-133, 1989.

BOPPRÉ, M. Chemical mediated interactions between butter-flies. In: Vane-Wright R.I.; Ackery, P. R. (eds), *The Biology of Butterflies*, v. 11. Academic Press, London, pg. 259--275, 1984.

BOPPRÉ, M. Lepidoptera and pyrrolizidine alkaloids: exemplification of complexity in chemical ecology. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, p. 165-185, 1990.

BOPPRÉ, M.; SCHNEIDER, D. The biology of *Cretonos* (Lepidoptera: Arctiidae) with special reference to the androconial system. *Zool. J. Linn. Soc.*, v. 96, n. 4, p. 339–356, 1989.

BORGES, E. O. et al. Terpenoids dominate the bouquet of volatile organic compounds produced by *Passiflora edulis* in response to herbivory by *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Arthropod-Plant Interactions*, v. 12, n. 1, p. 123–131, 2018.

BRANDÃO, A. D. S. et al. Spatial and temporal distribution of *Opsiphanes invirae* (Lepidoptera: Nymphalidae) in oil palm, Pará State, Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 12, n. 4, p. 464-469, 2017.

BRASIL. Ato nº 58, de 19 de novembro de 2010. Altera o Decreto 4074, de 04 de janeiro de 2002, e dispõe sobre aprovação de alterações nas recomendações de uso do produto Dipel com a inclusão da cultura do Dendê para o controle de

Brassolis sophorae e *Opsiphanes invirae*. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 nov. 2010. Seção 1, p.17.

BRISTOW, C. R. A revision of the brassoline genus *Opsiphanes* (Lepidoptera: Rhopalocera). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 101, pg. 203-293, 1991.

BRITO, M. R. M. **Efeitos da fragmentação de hábitat sobre borboletas frugívoras (Lepidoptera: Nymphalidae) em remanescente de Mata Atlântica no Rio Grande do Norte**. 2017. 39 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia), Efeitos da fragmentação de hábitat sobre borboletas frugívoras (Lepidoptera: Nymphalidae) em remanescente de Mata Atlântica no Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

BROWER, L. P.; BROWER, J.V.Z.; CRANSTON, F. P. Courtship behavior of the Queen butterfly, *Danaus gilippusberenice*. In: **Zoologica: scientific contributions of the New York Zoological Society**. New York, n.1, p.1–11, may, 1965.

BUTENANDT, A. Über den Sexual-Lockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*. Reidarstellung und Konstitutionsermittlung. **Z. Naturforsch**, v.14, p. 283–284, 1959.

BUTLER, C. G. Insect Pheromones. **Biological Reviews**, v. 42, p. 42-87, 1967.

CARLSSON, M. A. et al. Organization of the Olfactory System of Nymphalidae Butterflies. **Chemical Senses**, p. 355-367, 2013.

CASAGRANDE, M. M.; MIELKE, O. H. H. Larva de quinto estágio e pupa de *Opsiphanes quiteria meridionalis* Staudinger (Lepidoptera, Nymphalidae, Brassolinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 49, n.3, p. 421-424, 2005.

CASAGRANDE, M.M. Notas sistemáticas sobre Brassolinae. I. tribos (Lepidoptera, Nymphalidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 12, n. 3, p. 671-699, 1995.

CERUTI, F. C. Interações entre Feromônios de Insetos e Semioquímicos de Plantas. **Revista Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, pg. 73-82, 2007.

CHINCHILLA, C. Manejo integrado de problemas fitosanitarios en palma aceitera *Elaeis guineensis* en América Central. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología** (Costa Rica), v. 67, p. 69-82, 2003.

CORACINI, M. et al. Attraction of codling moth males to apple volatiles. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 110, n. 1, p. 1–10, 2004.

CORLEY, R. H. V. How much palm oil do we need? **Environmental Science and Policy**, v. 12, n. 2, p. 134–139, 2009.

CROCK, J.; WILDUNG, M.; CROTEAU, R. Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha x piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone (E)- β -farnesene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U.S.A., v. 94, p. 12833–12838, 1997.

CRUZ, C. D. Genes Software-extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.

CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

DA NEVES, M. P. Biology and External Morphology of Immatures of *Opsiphanes quiteria meridionalis* Staudinger (Lepidoptera: Nymphalidae). **Neotropical Entomology**, v. 45, p.13–21, 2016.

DARRAGH, K. et al. Male sex pheromone components in *Heliconius* butterflies released by the androconia affect female choice. **BioRxiv**, p. 1-23, 2017.

DAS, S. et al. Electrical synapses mediate synergism between pheromone and food odors in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201712706, 2017.

DUDAREVA, N. et al., (E) beta-Ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: Function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *Plant Cell*. v.15, n.5, pg. 1227-1241, 2003.

EL-SAYED, A. M. Potential of Mass Trapping for Long-Term Pest Management and Eradication of Invasive Species. **Journal of Economic Entomology**, v. 99, n. 5, p. 1550-1564, 2006.

EVENDEN, M. L.; SILK, P. J. 2016. The influence of Canadian research on semiochemical-based management of forest insect pests in Canada. **The Canadian Entomologist**, v. 148, 2016.

FAGERSTROM, T.; WIKLUND; C. Why do Males Emerge Before Females? Protandry as a Mating Strategy in Male and Female Butterflies. **Oecologia**, v. 52, p. 164-166, 1982.

FARRÉ-ARMENGOL, G. et al. β -Ocimene, a Key Floral and Foliar Volatile Involved in Multiple Interactions between Plants and Other Organisms. *Molecules*, v. 22, n. 7, p. 1148, 2017.

FERREIRA, J. M. S. **Produção integrada de coco: Pragas de coqueiro no Brasil de A a Z**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, v. 1, 2006. 1 CD-ROM.

FERREIRA, J. M. S.; TEODORO, A. V.; JÚNIOR, A. S. N.; GUZZO, E. C. Descrição, Bioecologia e Manejo das Lagartas-do-Coqueiro *Brassolis sophorae* L. e *Opsiphanes invirae* H. (Lepidoptera: Nymphalidae). **Comunicado Técnico**. n. 178, 2015.

FERREIRA, J.M.S et al. Pragas do coqueiro. In: FERREIRA, J. M.S.; WARWICK, D.R. N.; SIQUEIRA, L.A. (eds.). **A cultura do coqueiro no Brasil**. Aracaju: Embrapa-SPI, p. 189-268, 1998.

- FERREIRA, M. S. F.; LINS, P. M. P. Pragas do Coqueiro. In: FERREIRA, M. S. F.; FONTES, H. R. (eds.) **Produção Integrada de Coco**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 13-68, 2006.
- FOCKINK, D. H.; MISE, K. M.; ZARBIN, P. H. G. Male-produced sex pheromone of the carrion beetles, *Oxelytrum discicolle* and its attraction to food sources. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 8, p. 1056–1065, 2013.
- GANAI, M. A.; KHAN, Z. H.; DAR, M. A. Pheromones in lepidopteran insects: Types, production, reception and its application. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry JPP**, v. 6, n. 65, p. 2552–2558, 20017.
- GILLEY, D. C.; DEGRANDI-HOFFMAN, G.; HOOPER, J. E. Volatile compounds emitted by live European honey bee (*Apis mellifera* L.) queens. **Journal of Insect Physiology**, v.52, n.5, pag. 520-527, 2006.
- GINZEL, M.D. Olfactory Signals. In: BREED, M.; MOORE, J. (eds.), **Encyclopedia of Animal Behavior**. Elsevier Ltd., Oxford, UK. 2010.
- GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. **Wiley**, Chichester, 2000.
- GOULART, H. F. et al. Feromônios: Uma Alternativa Verde para o Manejo Integrado de Pragas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p.1205-1224, 2015.
- GRULA, J. W.; MCCHESENEY, J. D.; TAYLOR, O. R. Aphrodisiac pheromones of the sulfur butterflies *Colias eurytheme* and *C. Philodice* (Lepidoptera, Pieridae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 6, n. 1, p. 241–256, 1980.
- HABER, W. Evolutionary ecology of tropical mimetic butterflies (Lepidoptera: Ithomiinae). **Ph. D. dissertation**, University of Minnesota, 1978.
- HALLBERG, E. et al. Morphological characteristics of antennal sensilla in the European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Tissue and Cell**, v.26, p.489–502, 1994.
- HANSSON, B. S. Olfaction in Lepidoptera. **Experientia**, v. 51, n. 11, p. 1003–1027, 1995.
- HASSEMER, M. J. et al. Revisiting the male-produced aggregation pheromone of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera, Tenebrionidae): identification of a six-component pheromone from a brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 36, p. 6809–6818, 2016.
- HENGCHEN, L.; LARRY, P.; AND, R. J. B. Synergism between synthetic food odors and the aggregation. **Environmental Entomology**, v. 21, p. 156–159, 1992.
- HOGLUND, J. ; ALATALO, R. V. **Leks**. Princeton University Press. Princeton, 1995.

- HOMMA, A. K. O. et al. Sistema de Produção do Açaí. NOGUEIRA, O. L.; FIGUEIRÊDO, F. J. C.; MÜLLER, A. A. (eds.). **Embrapa Amazônia Oriental**, n. 4, 2005. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/125409/1/SISTEMA-PROD-4-ONLINE-.pdf>>. Acesso em: 07 maio 2018.
- HONDA, K.; HONDA, Y.; MATSUMOTO, J.; TSURUTA, Y., YAGI, W.; ÔMURA, H.; HONDA, H. Production and sex-pheromonal activity of alkaloid-derived androconial compounds in the danaine butterfly, *Parantica* (Lepidoptera: Nymphalidae: Danainae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 119, n. 4, p. 1036–1059, 2016.
- HOWSE, P. E, STEVENS, I.D.R., JONES, O.T. **Insect Pheromones and Their Use in Pest Management**. Chapman and Hall, London, pg. 256, 1996.
- KARLSON, P.; LUSCHER, M. Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. **Nature**, v.183, p. 55-56, 1959.
- KEMP, D. J.; WIKLUND, C. Fighting without weaponry : a review of male-male contest competition in butterflies. **Behavioral Ecology Sociobiology**, p. 429–430, 2001.
- KHRIMIAN, A. et al. Pheromone of the banana-spotting bug, *Amblypelta lutescens lutescens* Distant (Heteroptera: Coreidae): Identification, synthesis, and field bioassay. **Psyche (New York)**, v. 2012, 2012.
- KIRSCH, P. Pheromones: Their potential role in control of agricultural insect pests. **American Journal of Alternative Agriculture**, v. 3, n. 2-3, 1988.
- KNIGHT, A. L.; LIGHT, D. M. Attractants from Bartlett pear for codling moth, *Cydia pomonella* (L.), larvae. **Naturwissenschaften**, v. 88, n.8, pag. 339-342, 2001.
- KNIGHT, A. Monitoring oriental fruit moth and codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) with combinations of pheromones and kairomones. **Journal of Applied Entomology**, p. 1-12, 2014.
- KUMARA, A. D. N. T. et al. Periodicity of adult emergence and sexual behaviour of coconut black headed caterpillar , *Opisina arenosella* Walker (Lepidoptera: Oecophoridae), **Phytoparasitica**, 2015.
- LANDOLT, P. J.; PHILLIPS, T. W. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. **Annual Review of Entomology**, v. 42, n. 1, p. 371–391, 1997.
- LEMOES, W. P.; BOARI, A. J. Manejo de pragas e doenças no cultivo da palma de óleo na Amazônia. In: RAMALHO FILHO, A.; MOTTA, E. F. da. (Org.). **Zoneamento agroecológico, produção e manejo da palma de óleo na Amazônia. Embrapa Solos**, p. 145-152, 2010.
- LEPESME, P. **Les insectes des palmiers**. Paris: Paul Lechevalier, pag. 904, 1947.

LI, Y.; MATHEWS, R. A. In vivo real-time monitoring of aphrodisiac pheromone release of small white cabbage butterflies (*Pieris rapae*). *Journal of Insect Physiology*, v. 91–92, p. 107–112, 2016.

LIGHT, D. M. et al. A pear-derived kairomone with pheromonal potency that attracts male and female codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *Naturwissenschaften*, v. 88, n. 8, p. 333-338, 2001.

LIMA, R. L.; DELLA LUCIA, T.M.C. Biodinâmica dos Feromônios. In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA., eds.; **Feromônios de insetos: (biologia, química e emprego no manejo de pragas)**. Holos Editora: Ribeirão Preto, 2001.

LIU, H. et al. Scanning electron microscopy studies of antennal sensilla of *Isoceras sibirica* Alpheraky (Lepidoptera, Cossidae). **Annales de la Société entomologique de France** (N.S), v. 50, n. 3-4, p. 350-357, 2014.

LORDELLO, L. G. E. *Brassolis sophorae* lurida Stich, séria praga das palmáceas. **Sítios e Fazendas**, São Paulo, v. 14, n. 11, p. 9-17, 1949.

LORIA, R.; CHINCHILLA, C.; DOMÍNGUEZ, J.; MEXZON, R. Una trampa efectiva para capturar adultos de *Opsiphanes cassina* Felder (Lepidoptera: Brassolidae) y observaciones sobre el comportamiento de la plaga en palma de aceite. **Palmas**, v. 23, n. 1, p. 29-37, 2002.

MAFRA-NETO, A.; HABIB, M.E.M. Evidence that mass trapping suppresses pink bollworm in cotton fields. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.81, p.315-323, 1996.

MAISONNASSE, A. et al. New insights into honey bee (*Apis mellifera*) pheromone communication. Is the queen mandibular pheromone alone in colony regulation? **Frontiers in Zoology**, v. 18, p. 7-18, 2010.

MANN, F. et al. The Scent Chemistry of Heliconius Wing Androconia. **Journal of Chemical Ecology**, v. 43, n. 9, p. 843–857, 2017.

MARTINS, C. B. C. et al. Volatile Organic Compounds (VOCs) Emitted by the Herbivory of the Lepidopteran *Thelosia camina* and the Coleopteran *Hedypathes betulinus*. **Journal of the Brazilian Society**, v. 28, n. 7, p. 1204-1211, 2017.

MARTINS, C. B. C. et al. Volatile Organic Compounds (VOCs) Emitted by. v. 28, n. 7, p. 1204–1211, 2017.

MARTINS, L. P. et al. Butterflies of Amazon and Cerrado remnants of Maranhão, Northeast Brazil. **Biota Neotropica**, v. 17, n. 3, 2017.

MEINWALD, J. et al. Sex Pheromone of the Queen Butterfly: Chemistry. **Science**, v. 164, 1969.

MERIVEE, E. et al. Antennal sensilla of the ground beetle *Bembidion properans Steph* (Coleoptera: Carabidae). **Micron**, v. 33, p. 429-440, 2002.

MIKLAS, N. Repeatability of pheromone blend composition in individual males of the southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 26, n. 11, p. 2473–2485, 2000.

MONTEYS, V. S. et al. Sexual communication in day-flying Lepidoptera with special reference to castniids or “butterfly-moths”. **Bulletin of Entomological Research**, p. 1-11, 2016.

MORAES, M.C.B; LAUMANN, R.A; PAULA, D.P; PAREJA, M.; SILVA, C.C; VIERA, H.G.; NAIME, J.M; BORGES, M. Eletroantenografia - a antena do inseto como um biossensor. **Embrapa**, 2008.

MURALIMOHAN, K.; SRINIVASA, YB.; Female biased sex-ratio in a protandrous moth: challenging the mate opportunity hypothesis for explaining protandry. **Current Science**, v. 98, p. 557-562, 2010.

MYERS, J. Pheromones and Courtship Behavior in Butterflies. **American Zoologist**, v. 12, p. 545-551, 1972.

MYERS, J. The Structure of the Antennae of the Florida Queen Butterfly, *Danaus gilippus* Berenice (Cramer). **Journal Morphology**. p. 315-328, 1968.

MYERS, J.; BROWER, L. P. A behavioural analysis of the courtship pheromone receptors of the Queen butterfly, *Danaus gilippus berenice*. **Journal of Insect Physiology**, v. 15, n. 11, p. 2117-2130, 1969.

NATION, J. L. Biology of Pheromone Release By Male caribbean fruit flies, *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, n. 2, p. 553-554, 1990.

NAVARRO, D. M. A. F.; MURTA, M. M.; DUARTE, A. G.; LIMA, I. S.; NASCIMENTO, R. R.; SANTANA, A. E. G. Aspectos práticos relacionados ao uso do Rincoforol, o feromônio de agregação da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) no controle de pragas do coqueiro. Análise de sua eficiência em campo. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 32-36, 2002.

NETO C. DE SÁ, C.; FONTENELLE, J. C. R.; RIBEIRO, S. P.; MARTINS, R. P. Danos foliares causados por insetos em *Heliconia episcopalis* Vellozo (Heliconiaceae: Zingiberales) no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais. **Biota: Boletim Técnico Científico da Diretoria de Biodiversidade do IEF**, MG. v. 3, n. 6, p. 4-18, 2011 .

NEVES, D.; PALUCH, M. Biology and External Morphology of Immatures of *Opsiphanes quiteria meridionalis* Staudinger (Lepidoptera: Nymphalidae). **Neotropical Entomology**, v. 45, p.13-21, 2016.

NIEBERDING, C. M.; VOS, H.; SCHNEIDER, M.V.; LASSANCE, J.; ESTRAMIL, N.; ANDERSSON, J.; BANG, J.; HEDENSTROM, E.; LOFSTEDT, C.; BRAKEFIELD, P. M. The male sex pheromone of the butterfly *Bicyclus anynana*: Towards an evolutionary analysis. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, p. 1-12, 2008.

NISHIDA, R.; SCHULZ, S.; KIM, C. S.; FUKAMI, H.; KUWAHARA, Y.; HONDA, K.; HAYASHI, N. Male sex pheromone of a giant danaine butterfly, *Idea leuconoe*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 22, n. 5, p. 949–972, 1996.

ODENDAAL, F. J. et al. Structure and Function of the Antennae of *Euphydryas editha* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Journal of Morphology**, v.184, p.3-22,1985.

OEHLISCHLAGER, A. C. et al. Development of a Pheromone-Based Trapping System for *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 86, n. 5. p. 1381-1392,1993.

OLIVEIRA, I. F. **Vivendo na cidade**: borboletas frugívoras em uma paisagem urbana. 2017. 49f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

ÔMURA, H. et al. Two lactones in the androconial scent of the Lycaenid butterfly *Celastrina argiolus ladonides*. **Naturwissenschaften**, v. 100, n. 4, p. 373–377, 2013.

PARE, P. W.; TUMLINSON, J. H. Update on plant-insect interactions plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology*, v. 121, p. 325–331, 1999.

PARRA, E. et al. Evaluación de sustratos orgánicos y en combinación con insecticida para la captura de adultos de *Opsiphanes cassina felder* en una plantación de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacquin.) en el estado Zulia, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía*, v. 26, n. 4, p. 455–469, 2009.

PARRA, J.R.P. et al. **Controle Biológico no Brasil – Parasitóides e Predadores**. São Paulo: Manole, pg. 635, 2002.

PENG, C.-L. et al. Identification and field bioassay of the sex pheromone of *Trichophysetis cretacea* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of economic entomology**, v. 105, n. 5, p. 1566-1572, 2012.

PENZ, C. M. Evaluating the monophyly and phylogenetic relationships of *Brassolini* genera (Lepidoptera, Nymphalidae). **Systematic Entomology**, v. 32, n. 4, p. 668–689, 2007.

PENZ, C. M.; AIELLO, A.; SRYGLEY, R. B. Early stages of *Caligo illioneus* and *C. idomeneus* (Nymphalidae, Brassoliniinae) from Panamá, with remarks on larval food plants for the subfamily. **Journal of the Lepidopterist' Society**, v. 53, n. 4, p. 142–152, 1999.

PINHEIRO, C. E. G. et al. Why do the ithomiines (Lepidoptera, Nymphalidae) aggregate? Notes on a butterfly pocket in central Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n.4, p. 610-614, 2008.

- PINTO-ZEVALLOS, D. M.; STRAPASSON, P.; ZARBIN, P. H. G. Herbivore-induced volatile organic compounds emitted by maize: Electrophysiological responses in *Spodoptera frugiperda* females. **Phytochemistry Letters**, v. 16, p. 70–74, 2016.
- PLISKE, T. E.; EISNER, T. Sex Pheromone of the Queen Butterfly: Biology. **Science**, v. 164, n. 3884, p. 1170–1172, 1969.
- POLANCZYK, R. A. et al. Interação entre inimigos naturais: *Trichogramma* e *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas agrícolas. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, n. 2, p. 233-239, 2006.
- POPHOF, B. Olfactory responses recorded from sensilla coeloconica of the silkworm *Bombyx mori*. **Physiological Entomology**, v. 22, n. 3, p. 239-248, 1997.
- PORTELA-DUSSAN, D. D. et al. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. **Nova - Publicación Científica em Ciências Biomédicas**, vol.11, n.20, pg.87-96, 2013.
- RAI, B. K. *Brassolis sophorae* and *Castnia daedalus*: chemical control of these major pests of coconut in Guyana. **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, n. 66, p. 177-180, 1973.
- RAUSER, C. L.; RUTOWSKI, R. L. Male-specific structures on the wings of the gulf fritillary butterfly, *Agraulis vanillae* (Nymphalidae), **Journal of the Lepidopterists' Society**, v. 57, n. 4, p. 279-283, 2003.
- REGNIER, F. E, LAW, J. H. Insect pheromones. **The Journal of Lipid Research**, v. 9, n. 5, p. 541-51, 1968.
- RIBEIRO, R. C. et al. *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae): a potential biological control agent of lepidopteran pests of oil palm in the Brazilian Amazon. **Florida Entomologist**, v. 96, n. 2, 2013.
- RIBEIRO, R. C.; LEMOS, W. P.; BERNARDINO, A. S.; BUECKE, J.; MULLER, A. A. Primeira ocorrência de *Alcaeorrhynchus grandis* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) predando lagartas desfolhadoras do dendezeiro no Estado do Pará. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 1, p. 131–132, 2010.
- RODRIGUEZ, G. et al. Evaluación de atrayentes orgánicos para la captura de adultos de *Opsiphanes cassina felder*, defoliador de la palma aceitera. **Agronomía Trop.**, v. 59, n. 2, p. 173-182, 2009.
- ROELOF, W. L.; CARDE, R. T. Responses of lepidoptera to synthetic sex pheromone chemicals and their analogues. **Annual Review Entomology**, v. 22, p. 377-405, 1977.
- ROSENBERG, R. H.; ENQUIST, M. Contest behaviour in Weidemeyer's admiral butterfly *Limenitis weidemeyerii* (Nymphalidae): the effect of size and residency. **Anita. Behav.**v. 42, p. 805-811,1991.

RUSCHIONI, S. et al. Fine Structure of Antennal Sensilla of *Paysandisia archon* and Electrophysiological Responses to Volatile Compounds Associated with Host Palms. **Plos One**, p. 1-17, 2015.

RUTOWSKI, R. L. Male scent-producing structures in *Colias* butterflies - Function, localization, and adaptive features. **Journal of Chemical Ecology**, v. 6, n. 1, p. 13–26, 1980.

SALGADO-NETO, G.; LOPES-DA-SILVA, M. First report of parasitism on pupae of *Opsiphanes invirae amplificatus* Stichel (Lepidoptera, Nymphalidae) by *Conura* (*Conura*) *maculate* (Fabricius) (Hymenoptera, Chalcididae) in Rio Grande do Sul, Brazil. Short Communication. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, n. 2, p. 285–286, 2011.

SARTO, I.; MONTEYS, V. et al. Moths behaving like butterflies. Evolutionary loss of long range attractant pheromones in castniid moths: a *Paysandisia archon* model. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2012.

SCHNEIDER, D. Insect Antennae. **Annual Review of Entomology**, v.9, pg. 103-122, 1964.

SCHNEPF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

SCHULZ, S. et al. An antiaphrodisiac in *Heliconius melpomene* butterflies. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 1, p. 82–93, 2008.

SCHULZ, S. et al. Semiochemicals derived from pyrrolizidine alkaloids in male *Ithomiine* butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae), **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 699-713, 2004.

SCHULZ, S.; BOPPRE, M.; VANE-WRIGHT, R. I. Specific mixtures of secretions from male scent organs of *African milkweed* butterflies (Danainae). *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, v. 342, n. 1300, p. 161-181, 1993.

SCUDDER, S. H. Antigeny, or sexual dimorphism in butterflies. **Proceedings of the American Academy of Arts and Science**, v.12, pg. 150-158, 1877.

SILBERGLIED, R. **Visual communication and sexual selection in butterflies**. In: *The biology of butterflies* (R.I. Vane-Wright; P.R. Ackery, ed.). Princeton University Press, Princeton, p. 207-223, 1984.

SILVA, A. G. da. et al. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil: seus parasitas e predadores**. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, Parte II, tomo 1, p. 622, 1968.

SILVA, L. A. et al. Complete genome sequence and structural characterization of a novel iflavirus isolated from *Opsiphanes invirae* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.130, p. 136–140, 2015.

SRYGLEY, R. B.; PENZ, C. M. Lekking in Neotropical Owl Butterflies , *Caligo illioneus* and *C. oileus* (Lepidoptera : Brassolinae). v. 12, n. 1, p. 81-82, 1999.

TAKEUCHI, T. Agonistic display or courtship behavior ? A review of contests over mating opportunity in butterflies. **Journal of Ethology**, v. 35, n. 1, p. 3-12, 2017.

TANG, R.; ZHANG, F.; ZHANG, Z. N. Electrophysiological responses and reproductive behavior of fallwebworm moths (*Hyphantria cunea* Drury) are influenced by volatile compounds from its mulberry host (*Morus alba* L.). **Insects**, v. 7, n. 2, 2016.

TANG, R.; ZHANG, J. P.; ZHANG, Z. N. Electrophysiological and Behavioral Responses of Male Fall Webworm Moths (*Hyphantria cunea*) to Herbivory-Induced Mulberry (*Morus alba*) Leaf Volatiles. PLoS ONE, v. 7, n. 11, p. 1-7, 2012.

THANH, L.; CHAUHAN, K. R. Simple and short synthesis of trans-(R)-nerolidol, a pheromone component of fruit spotting bug. Natural Product Communications, v. 9, n. 3, pg. 297-298, 2014.

TINÔCO, R. S. **Determinação do nível de dano econômico para *Opsiphanes invirae* Hubner, 1808** (Lepidoptera: Nymphalidae) em palma de óleo. 2016. 66f. Tese (Doutorado em Agronomia-Entomologia Agrícola), UNESP, Jaboticabal, p. 52, 2016.

TREMATERRA, P. Integrated Pest Management of stored-product insects: practical utilization of pheromones. **Anz. Schadlingskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz**, v.70, 41-44, 1997.

TRIGO, J. R. et al. Qualitative patterns of pyrrolizidine alkaloids in ithomiinae butterflies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, n. 3, p. 181-188, 1996.

TRIGO, J. R.; BARATA, L. E. S.; BROWN, K. S. Stereochemical inversion of pyrrolizidine alkaloids by *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae): Specificity and evolutionary significance. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 11, p. 2883–2899, 1994.

TRIGO, J. R.; BARATA, L. E. S.; BROWN, K. S. Stereochemical inversion of pyrrolizidine alkaloids by *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae): Specificity and evolutionary significance. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 11, p. 2883-2899, 1994.

TUMLINSON, J. H.; MITCHELL, E. R.; TEAL, P. E. A.; HEATH, R. R.; MENGELKOCH, L.J. Sex pheromone of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) - Identification of components critical to attraction in the field. **Journal of Chemical Ecology**, v. 12, n. 9, p. 1909-1926, 1986.

UJVÁRY, I. Pest Control Agent from Natural Products In: KRIEGER, R.I. (edit.) Handbook of Pesticide Toxicology, **Academic Press**, San Diego, 3. ed., 2010.

VACHON, V.; LAPRADE, R.; SCHWARTZ, J.L. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 111, n. 1, pg. 1-12, 2012.

VANE-WRIGHT, R. I.; BOPPRE, M. Visual and Chemical Signalling in Butterflies: Functional and Phylogenetic Perspectives. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 340, n. 1292, p. 197-205, 1993.

VILELA, E. F. Adoção de feromônios no manejo integrado de pragas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.27, p. 315-318, 1992.

VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. Introdução aos semioquímicos e terminologia. In: **Feromônios de insetos: (biologia, química e emprego no manejo de pragas)** ; VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C., (eds.); Holos Editora: Ribeirão Preto, 2001.

WELTER, S. C. et al. Pheromone mating disruption offers selective management options for key pests Stephen, **California Agriculture**, v. 59, n. 1, 2005.

WITZGALL, P.; KIRSCH, P.; CORK, A. Sex pheromones and their impact on pest management. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 1, p. 80-100, 2010.

WITZGALL, P.; KIRSCH, P.; CORK, A. Sex pheromones and their impact on pest management. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 1, p. 80–100, 2010.

WITZGALL, P.; STELINSKI, L.; GUT, L.; THOMSON, D. Codling Moth Management and Chemical Ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 53, n. 1, p. 503–522, 2008.

WYATT, T. D. Fifty years of pheromones. **Nature**, v. 457, n.15, 2009.

XIANGQUN, Y. et al. Ultrastructure of antennal sensilla of four skipper butterflies in *Parnara* sp . and *Pelopidas* sp . (Lepidoptera , Hesperiiidae). **ZooKeys**, v. 399, p. 17-27, 2014.

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

YILDIZHAN, S. et al. Aphrodisiac pheromones from the wings of the small cabbage white and large cabbage white butterflies, *Pieris rapae* and *Pieris brassicae*. **ChemBioChem**, v. 10, n. 10, p. 1666-1677, 2009.

ZAGATTI, P. et al. Sex pheromones of rice moth, *Corcyra cephalonica* Stainton. **Journal of Chemical Ecology**, v. 13, n. 7, p. 1561-1573, 1987.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 722–731, 2009.

ZARBIN, P. H. G.; VILLAR, J. A. F. P.; CORRÊA, A. G. Insect pheromone synthesis in Brazil: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 6, pg.1100–1124, 2007.

ZONNEVELD, C., Polyandry and protandry in butterflies. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 54, p. 957-976, 1992.

ANEXO A - Fac- símile do Pedido de Invenção BR 102018000784, depositado pelo NIT/UFAL no INPI em 15/01/2018

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Monitoramento e controle comportamental com feromônio sexual da praga desfolhadora, *Opsiphanes invirae* Hubner, 1808 (Lepidoptera: Nymphalidae)

Resumo: A presente invenção faz referência à formulação do feromônio sexual eficaz no monitoramento e controle da praga desfolhadora *Opsiphanes invirae* em plantios de arecáceas, como o coqueiro e dendezeiro, pelos sérios danos causados à estas culturas de interesse socioeconômico. Tal composição contém β-farneseno, (E)-nerolidol e (Z)-7-heptadeceno, variando na proporção 1:1:1 a 1:10:20, respectivamente. No experimento em campo, o uso desta invenção, mostrou ser um produto promissor para a captura dos insetos adultos de *O. invirae*. Assim, esta invenção também faz referência ao método de controle desta praga com uso da formulação, objeto desta invenção. Em virtude de futuras necessidades, esta invenção pode estender-se a outras culturas e regiões afetadas por este inseto-praga.

Figura a publicar: 01

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 15/01/2018 às 13:22, Petição 870180003366

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 10**Nome:** KECIANE MESQUITA DAS CHAGAS**CPF:** 64454126372**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Outras ocupações não especificadas anteriormente**Endereço:** Rua Pardais, Cond. Europa, bloco-1 apt203**Cidade:** São Luiz**Estado:** MA**CEP:** 65075-310**País:** BRASIL**Telefone:** (98) 981 265757**Fax:****Email:** kecianemesquita@ifma.edu.br**Inventor 2 de 10****Nome:** ANTÔNIO EUZÉBIO GOULART SANTANA**CPF:** 11867760649**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Prefeito Abdon Arroxelas, 58, apto. 903**Cidade:** Maceió**Estado:** AL**CEP:** 57035-380**País:** BRASIL**Telefone:** (82) 988 506526**Fax:****Email:** aegsal@gmail.com**Inventor 3 de 10**

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 15/01/2018 às 13:22, Petição 870180003366

Nome: GAUS SILVESTRE DE ANDRADE LIMA

CPF: 88892719491

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Condomínio Monte Belo, Quadra D2, Lote 22

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57046-415

País: BRASIL

Telefone: (82) 988 126822

Fax:

Email: gaus@ceca.ufal.br

Inventor 4 de 10

Nome: HENRIQUE FONSECA GOULART

CPF: 03797757433

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Dr. Antônio Gomes de Barros, 123. Apt. 702, BI 02

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57036-000

País: BRASIL

Telefone: (82) 999 828097

Fax:

Email: fonsecagoulart@gmail.com

Inventor 5 de 10

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 15/01/2018 às 13:22, Petição 870180003366

Nome: MERYBETH FERNANDEZ TRIANA

CPF: 70460754416

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua Teodomiro Deodato Santos, 96. Bloco 2, apt. 608

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57083-150

País: BRASIL

Telefone: (82) 996 304937

Fax:

Email: merybeth.triana@iqb.ufal.br

Inventor 6 de 10

Nome: JAKELINE MARIA DOS SANTOS

CPF: 06076828412

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Conj. Luiz Pedro III, Rua Cacaueiro, nº 19, Benedito Bentes II.

Cidade: MACEÍO

Estado: AL

CEP: 57085-310

País: BRASIL

Telefone: (82) 999 324874

Fax:

Email: jackbilu@hotmail.com

Inventor 7 de 10

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 15/01/2018 às 13:22, Petição 870180003366

Nome: ISIS TORRES SOUZA

CPF: 05021380419

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua Dr. João Teixeira Cavalcante, 290 – Edf Topázio ap 202

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57052-610

País: BRASIL

Telefone: (82) 998 023304

Fax:

Email: isinhasouza@gmail.com

Inventor 8 de 10

Nome: RICARDO SALLES TINÔCO

CPF: 91515963691

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rod. Augusto Montenegro, 3975 Apt° 1102, bloco 1A, Condomínio Total Life

Cidade: Belém

Estado: PA

CEP: 66820-000

País: BRASIL

Telefone: (19) 991 721580

Fax:

Email: tinoco.rs@gmail.com

Inventor 9 de 10

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 15/01/2018 às 13:22, Petição 870180003366

Nome: PAULO MANOEL PONTES LINS

CPF: 45387974487

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Av. Gentil Bittencourt, 1226, apto 1902

Cidade: Belém

Estado: PA

CEP: 66040-174

País: BRASIL

Telefone: (19) 991 144123

Fax:

Email: paulo@sococo.com.br

Inventor 10 de 10

Nome: MARIANA OLIVEIRA BREDÁ

CPF: 05745716479

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Avenida general Luís de França Albuquerque, nº 333.

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57039-000

País: BRASIL

Telefone: (82) 999 754233

Fax:

Email: breda.mariana@hotmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	ComprovanteBB - 2018-01-15-095017.pdf
Relatório Descritivo	RELAT+ôRIO DESCRITIVO_final_SUBMISSÃO_SemDocII.pdf
Reivindicação	REIVINDICAÇÕES (1)_final_SUBMISSÃO.pdf
Desenho	DESENHOS_final_SUBMISSÃO.pdf
Resumo	resumo_SUBMISSÃO.pdf

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 15/01/2018 às 13:22, Petição 870180003366

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 15/01/2018 às 13:22, Petição 870180003366