

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

MÉRCIA DOS SANTOS SILVA

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO REPRODUTIVO E OLFATIVO DE *Zabrotes
subfasciatus* (COLEOPTERA: BRUCHIDAE) E IDENTIFICAÇÃO DOS
CONSTITUINTES QUÍMICOS PRESENTES NOS EXTRATOS DE MACHOS E
FÊMEAS DESSA ESPÉCIE**

Maceió-AL
2005

MERCIA DOS SANTOS SILVA

ESTUDO DO COMPORTAMENTO REPRODUTIVO E OLFATIVO DE *Zabrotes subfasciatus* (COLEOPTERA: BRUCHIDAE) E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS PRESENTES NOS EXTRATOS DE MACHOS E FÊMEAS DESSA ESPÉCIE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana

Maceió – AL
2005

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- S586e Silva, Mercia dos Santos.
Estudo do comportamento reprodutivo e olfativo de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) e identificação dos constituintes químicos presentes nos extratos de machos e fêmeas dessa espécie / Mercia dos Santos Silva. – 2005.
93 f. : il., grafs. e tabs.
- Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant’Ana.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2005.
- Bibliografia. f. 87-93.
1. *Zabrotes*. 2. Feromônio. 3. Caruncho. 4. Olfatômetro. 5. Infoquímicos.
6. Feijão. I. Título.

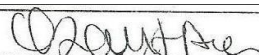
CDU: 577.19

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

Membros da Comissão julgadora da banca de defesa de dissertação de MÉRCIA DOS SANTOS SILVA: **Estudo do comportamento reprodutivo e olfativo de *Zabrotes Subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) e identificação dos constituintes químicos presentes nos extratos de machos e fêmeas dessa espécie**, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 03 de outubro de 2005.

Orientador:

ANTÔNIO EUZÉBIO GOULART SANTANA

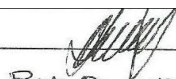


Comissão Julgadora:

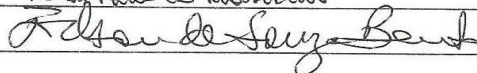
REGINAUDO BARROS

RUTH RUFINO DO NASCIMENTO

EDSON DE SOUZA BENTO



Ruth Rufino do Nascimento



Dedico aos meus pais , Divani Telmira dos Santos e
Jadir Chaves da Silva (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente a Deus por me permitir iniciar e concluir essa etapa importantíssima da minha vida.
- Ao Prof. Dr Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, pela orientação, paciência e amizade.
- Ao Prof. Dr. Fernando Antônio Cavalcante Mendonça pela atenção, amizade, e ensinamentos que foram de extrema importância para o meu trabalho.
- Aos Prof. Dra. Ruth Rufino, Dr. Edson Bento e Dr. Reginaldo Barros pela atenção e sugestões.
- A Prof. Dra. Denise Pinheiro e ao Prof. Dr. Ivanildo pelas sugestões dadas.
- Ao Prof. Dr Eraldo Lima por ter me acolhido no BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa.
- Aos professores Luiz Carlos, Iracilda Lima, Edson Bento, Marília, Margarida, Nivaldo e a todos os outros que fazem parte deste departamento.
- Ao doutorando e amigo Johnnatan Duarte, por ter me ajudado nos testes de GC-MS.
- Ao pessoal do Laboratório de Pesquisas de Recursos Naturais setor larvicida, Karla Porto, Ewerton, Kadedja, André Lima, Raquel, Rosevaldo, Karlos, Kelly, Joseane e Cenira.
- A Msc Ana Vitta e ao Dr. Sérgio Tinoco por terem me ajudado com os testes eletroantegráficos em Viçosa e a todos que comigo estiveram.
- A Sirlene e família pela amizade e confiança em me acolher em sua residência durante minha estadia em Viçosa.
- Aos colegas, Adriana Mendonça, Adriana Todaro, Carlos Eduardo, Anderson, Emília, Lizete, Priscila e todos os outros
- Aos funcionários Aldir e Dona Margarida pela atenção e ajuda oferecida.
- Ao Departamento de Química por permitir a realização desse trabalho.

Este trabalho contou com o apoio financeiro das seguintes instituições:

Universidade Federal de Alagoas;

FAPEAL, CNPq e CAPES,

a todos, o meu muito obrigado.

RESUMO

O *Zabrotes subfasciatus* (Boh 1833) (Coleoptera: Bruchidae) é conhecido vulgarmente como caruncho do feijão sendo uma das principais pragas de grãos armazenados. O controle dessa praga é feito basicamente utilizando-se inseticidas químicos que são eficientes no controle mas é altamente tóxicos ao homem e ao meio ambiente. Na procura por alternativas de controle menos agressiva, estudamos a ação dos infoquímicos no controle do *Zabrotes subfasciatus*. O estudo comportamental para esclarecimento de aspectos reprodutivos e da comunicação intra e interespecificas foram realizados assim como a identificação dos constituintes químicos presentes nos extratos de machos e fêmeas dessa praga. Foram observada primeiramente a seqüência de corte e cópula do *Z. subfasciatus* o qual resultou em um etograma. Em seguida foi analisado o comportamento seletivo da fêmea em relação ao parceiro e as diferenças das proporções sexuais que influíram na diminuição do número de acasalamentos. Para estudos da comunicação intra e interespecifica, foram realizados testes olfatométricos e eletroantegráficos. Utilizando olfatometria foi confirmado ser as fêmeas as responsáveis pela liberação do feromônio sexual, o qual exerceu atratividade apenas nos machos. A planta hospedeira não influenciou na produção do feromônio. Extratos obtidos em diclorometano foram mais eficientes na atratividade que extratos obtidos em hexano, mas não mais atrativo que as fêmeas vivas. Nos testes eletroantegráficos apenas os machos responderam de maneira positiva aos tratamentos; fêmeas vivas e extratos de fêmeas, fêmeas mais feijão utilizando como o solvente o diclorometano, reforçando a ideia da fêmea ser o sexo liberador do feromônio. Os extratos de machos e fêmeas foram analisados em (CG-EM). Extratos de fêmeas apresentaram maior quantidade e variedade de compostos químicos que os extratos dos machos. Em extratos de fêmeas foram encontrados uma serie homologa de hidrocarbonetos e compostos oxigenados como; álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres e éteres. Constatou-se que há diferenças quanto à morfologia das cerdas de machos e fêmeas de *Z. subfasciatus*. As fêmeas apresentam cerdas mais ramificadas e volumosas enquanto os machos possuem cerdas filiformes.

Palavras-Chave: *Zabrotes*. Feromônio. Caruncho. Olfatômetro. Infoquímicos. Feijão

ABSTRACT

The *Zabrotes subfasciatus* (Boh 1833) (Coleoptera: Bruchidae) is known popularly as weevil of beans being one of the more important pests of stored grains. The pest control is performed basically using efficient chemical insecticides, however, they cause harm to men, fauna and flora, in the surroundings, being non-specific. In the search for alternative and less aggressive control, we study the action of infochemicals in the control of the *Zabrotes subfasciatus*. The study of reproductive aspects and of the intra- and interespecific communication had been carried out as well as the identification of the chemical constituents of the extracts of males and females of *Zabrotes subfasciatus*. The sequence of courtship and mating of the *Z. subfasciatus* had been first observed, which resulted in an etogram. After that the selective behavior of the female in relation to the partner and the differences of the sexual reasons that had influenced in the reduction of the number of mating were analyzed. For studies of the intra and interspecific communication, the study had been conducted through olfactometric and electroantennographic tests. Using olfactometry, it was confirmed that the females are responsible for the release of the sexual pheromone, which exerted attractiveness only toward the males. The plant hostess did not influence in the production of the pheromone. Extracts prepared with dichloromethane had been more efficient in the attractiveness than hexanic extracts, but were less attractive than the alive females. In the electroantennography tests only the males had answered in a positive way to the treatments that consisted of alive females and extracts of females, females plus beans, using dichloromethane as solvent, in order to strengthen the idea of the female being the releaser of the sexual pheromone. The extracts of males and females had been analyzed through GC-MS, to know their chemical contents. Extracts of females had presented greater amount and variety of chemical compounds than the extracts of the males. In the extracts of females, a homologous series of hydrocarbons, alcohols, carboxylic acids, esters and ethers had been found. Morphology differences between the bristles of males and females of *Z. subfasciatus* were observed. The females present ramified and voluminous bristles, while the males possess filiform bristles

Key Words: *Zabrotes*. Pheromone. Pest, Olfactometry. Infochemicals. Beans

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Adultos de <i>Zabrotes subfasciatus</i>	20
Figura 2 - Fases de vida do <i>Z. subfasciatus</i>	21
Figura 3 - Grãos de feijão danificados por <i>Z. subfasciatus</i>	22
Figura 4 - Classificação dos infoquímicos	26
Figura 5 - Colônia de <i>Zabrotes subfasciatus</i>	40
Figura 6 - Placas de Petri usadas como arenas de observação de casais de <i>Z. subfasciatus</i>	42
Figura 7 - Sistema empregado na coleta de voláteis de <i>Z. subfasciatus</i>	43
Figura 8 - Eletroantenógrafo utilizado nos testes de eletroantenografia	44
Figura 9 - Olfatômetro em “Y” usado nos estudos da ecologia química de <i>Zabrotes subfasciatus</i> .(a) olfatômetro (b) “Y”(c) Câmara-teste para tratamento (d) Base do olfatômetro	48
Figura 10 - Sistema utilizado na preparação do diazometano	49
Figura 11 - Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa utilizado nas análises dos extratos de machos e fêmeas de <i>Z. subfasciatus</i>	51
Figura 12 - (a) macho e fêmea de <i>Z. subfasciatus</i> (b) macho tentando a monta sobre a fêmea (c) cópula (d) macho e fêmea parados após a cópula.....	54
Figura 13 - Etograma do comportamento de corte e cópula de adultos de <i>Z. subfasciatus</i>	55
Figura 14 - Vista dorsal de <i>Z. subfasciatus</i> (a) macho (b)fêmea.....	56
Figura 15 - Cerdas dorsais de <i>Z. subfasciatus</i> em destaque (a) macho (b) fêmea	56
Figura 16 - Número de acasalamento bem sucedido sob diferentes razões sexuais entre adultos de <i>Z. subfasciatus</i>	58

Figura 17 - Registros eletroantegráficos feitos em antenas de machos.....	62
Figura 18 - Registro eletroantegráficos feitos em antenas de fêmeas.....	63
Figura 19 - Influência da idade dos insetos nos graus de atratividades para ambos os sexos, onde A corresponde a machos testando , machos, B fêmeas testando fêmeas, C fêmeas testando machos e D machos testando fêmeas.....	64
Figura 20 - Relação entre atratividade e idade dos insetos, onde A corresponde a machos testando machos,B fêmeas testando fêmeas,C fêmeas testando machos e D machos testando fêmeas.....	65
Figura 21- Atratividade, onde: A) Fêmeas de 1 a 3 dias testando machos; B) Macho de 1 a 3 dias testando fêmeas; C) Fêmeas de 1 a 3 dias testando fêmeas; e D) Machos de 1 a 3 dias testando machos. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si.....	66
Figura 22- Atratividade, onde: E) Fêmeas de 4 a 6 dias atraindo machos; F) Machos de 4 a 6 dias atraindo fêmeas;G) Fêmeas de 4 a 6 Diasatraindo fêmeas; e H) Machos de 4 a 6 dias atraindo machos. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si.....	67
Figura 23 - Influencia da idade e da presença de plena hospedeira na atratividade para machos. Onde: A) Fêmeas de 4 dias de emergidas; B) Fêmeas de 3 dias de emergidas; C)Fêmeas de 3 dias + Feijão ; e E) controle branco. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	68
Figura 24 - Atratividade de extratos de fêmeas de <i>Z. subfasciatus</i> obtidos com diferentes solventes frente a machos coespecíficos.Onde: 1- diclorometano (CH ₂ Cl ₂); 2 - controle (apenas CH ₂ Cl ₂); 3 - Hexano (C ₆ H ₁₄); 4 - controle (apenas C ₆ H ₁₄). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	70
Figura 25 - Atratividade de machos por diferentes tratamentos onde 1- Fêmeas vivas; 2 – Extrato em diclorometano e 3 – controle (apenas solvente). Médias seguida de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	71
Figura 26 - Cronograma do extrato de fêmeas de <i>Z. subfasciatus</i> obtidos através de aeração.....	72

Figura 27- Cronograma do extrato de machos de <i>Z. subfasciatus</i> obtidos através de aeração.....	72
Figura 28 - Espectro de massa do Decano.....	75
Figura 29 - Espectro de massa do 2-Etil-1-hexanol.....	75
Figura 30 - Espectro de massa do Isooctivinil éter.....	76
Figura 31- Espectro de massa do 5-Metil-1-hexanol.....	76
Figura 32 - Espectro de massa como 2-metildecano.....	76
Figura 33 - Espectro de massa do 3-metildecano.....	76
Figura 34 - Espectro de massa do 1,3-Dioxan-5-ol.....	77
Figura 35 - Espectro de massa do Undecano.....	77
Figura 36 - Espectro de massa do 3-Etil-4-metil-3-penten-2-ol.....	77
Figura 37 - Espectro de massa do Dietilenoglicol.....	77
Figura 38 - Espectro de massa do Hexanoato de E-3-hexenila.....	78
Figura 39 - Espectro de massa do 2,4-Dimetil-3-pentanol.....	78
Figura 40 - Espectro de massa do Dodecano.....	78
Figura 41- Espectro de massa do 1-Etoxi-2-propanol.....	78
Figura 42 - Espectro de massa do 2-Cicloexenona.....	79
Figura 43 - Espectro de massa do Tetradecano.....	79
Figura 44 - Espectro de massa do 5-Etil-2-heptanol.....	79
Figura 45 - Espectro de massa do Pentadecano.....	79
Figura 46 - Espectro de massa do Hexadecano.....	80
Figura 47 - Espectro de massa do Heptadecano.....	80
Figura 48 - Espectro de massa Hexadecanoato de metila.....	80

Figura 49 - Espectro de massa Hexadecanoato de etila.....	80
Figura 50 - Espectro de massa do 9-E-Octadecenoato de metila.....	81
Figura 51- Espectro de massa do 3, 7, 11,15- Tetrametilexadecanoato de metila.....	81
Figura 52 - Espectro de massa do 9-Z-Octadecenoato de metila.....	81
Figura 53 - Espectro de massa do Octadecenoato de etila.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais insetos pragas encontrados na cultura do feijoeiro.....	19
Tabela 2 - Insetos testados e tratamentos utilizados em testes de eletroantenografia.....	45
Tabela 3 - Insetos testados e tratamentos utilizados no primeiro grupo de bioensaios no olfatômetro.....	46
Tabela 4 - Insetos testados e tratamentos utilizados no segundo grupo de bioensaios no olfatômetro.....	47
Tabela 5 - Insetos testados e tratamentos utilizados no terceiro grupo de bioensaios no olfatômetro.....	47
Tabela 6 - Respostas eletroantegráficas realizadas em antenas de machos de <i>Z. subfasciatus</i>	60
Tabela 7 - Respostas eletroantegráficas realizadas em antenas de fêmeas de <i>Z. subfasciatus</i>	61
Tabela 8 - Constituintes químicos dos extratos obtidos por aeração de machos e fêmeas de <i>Z. subfasciatus</i>	73

LISTA DE ABREVIATURAS

Ddp	Diferença de potencial
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FID	Detector de ionização em chama
GC-EAD	Cromatografia acoplada a eletroantenografia
GC-MS	Cromatografia acoplada a espectrometria de massas
IE	Ionização por impacto eletrônico
IQ	Ionização química
MIP	Manejo Integrado de Pragas
PBS	Solução tampão salina fosfato
UR	Umidade relativa

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	17
1.1	Leguminosas	17
1.2	Feijão <i>Phaseolus vulgaris</i>	17
1.2.1	Importância econômica.....	17
1.2.2	Importância nutricional.....	18
1.2.3	Pragas limitantes da cultura do feijão.....	18
1.3	<i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boh. 1833)	19
1.3.1	Classificação e distribuição.....	19
1.3.2	Biologia.....	20
1.3.3	Danos.....	22
1.3.4	Métodos de controle.....	22
1.3.4.1	Controle químico.....	22
1.3.4.2	Controle alternativo através do manejo integrado de pragas.....	23
1.4	Infoquímicos	24
1.4.1	Emprego do uso do feromônio no manejo integrado de pragas.....	26
1.4.2	Feromônio de coleópteros, pragas de grãos armazenados.....	27
1.5	Técnicas aplicadas ao estudo comportamental de insetos	33
1.5.1	Olfatometria.....	34
1.5.2	Eletroantenografia.....	35
1.6	Técnicas aplicadas a extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos	36
1.6.1	Extração.....	36
1.6.2	Aeração.....	36
1.6.3	Extração direta por solvente.....	37
1.6.4	Concentração dos extratos.....	37
1.6.5	Identificação de feromônios.....	38
1.6.5.1	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.....	38
1.6.5.2	Cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia.....	38

1.7	Objetivos	39
1.7.1	Objetivo Geral.....	39
1.7.2	Objetivos Específicos.....	39
2	MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1	Obtenção dos insetos	40
2.2	Manutenção das colônias	40
2.3	Bioensaios comportamentais de acasalamento	41
2.4	Extração de infoquímicos	42
2.4.1	Sistema de aeração.....	42
2.4.2	Obtenção de infoquímicos.....	43
2.5	Eletroantenografia	43
2.6	Bioensaios comportamentais em olfatômetro	45
2.6.1	Confecção do olfatômetro.....	45
2.6.2	Bioensaio em olfatômetro.....	45
2.7	Isolamento e identificação de constituintes químicos presentes em extratos de <i>Zabrotes subfasciatus</i> resultantes de aeração	49
2.7.1	Preparação do diazometano.....	49
2.7.2	Metilação do extrato.....	50
2.7.3	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)....	50
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1	Estudo do comportamento de acasalamento do caruncho do feijão <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boh. 1833) (Coleoptera: bruchidae)	52
3.1.1	Bioensaios para análise da sequência de corte e cópula de <i>Zabrotes subfasciatus</i>	52
3.1.2	Bioensaio para análise do comportamento seletivo da fêmea em relação ao parceiro.....	57
3.2	Estudo comportamental para avaliação da comunicação intra e interespecífica de <i>Zabrotes subfasciatus</i> e <i>Phaseolus vulgaris</i>	59
3.2.1	Estudos eletroantegráficos.....	59

3.2.2	Bioensaios em olfatômetro.....	64
3.3	Isolamento e identificação de constituintes químicos presentes em extratos de <i>Zabrotes subfasciatus</i> resultantes de aeração.....	71
4	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS.....	87

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Leguminosas

A família *Leguminosae* é uma das maiores dentre as dicotiledôneas, compreendendo mais de 13.000 espécies reunidas em mais de 600 gêneros distribuídos mundialmente, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. As leguminosas se caracterizam pela frutificação em vagem (fruto simples, apocárpico, que se fende em duas valvas). A família *Leguminosae* se divide nas subfamílias *Mimosoideae*, *Caesalpiniaceae* e *Fabaceae* (*Papilionaceae*) (JOLY, 1998). Embora alguns autores coloquem como famílias separadas (CRONQUIST, 1988).

No Brasil, duas espécies de leguminosas da subfamília *Fabaceae* possuem o cultivo e o consumo bastante regionalizados: O caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., também conhecido como feijão- do-Norte, feijão de corda, macaçar além de outros nomes; e o feijão-comum, *Phaseolus vulgaris* (L.), que representa 70% da produção brasileira das leguminosas, excetuando-se a soja, que é largamente produzida nos estados do Nordeste, Centro e do Sul do Brasil (BRIGIDE, 2002).

1.2 Feijão *Phaseolus vulgaris* L.

1.2.1 Importância econômica

Há grandes variações regionais quanto ao gosto e preferência por tipos de grãos consumidos. O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a espécie mais cultivada entre as demais do gênero *Phaseolus*. Considerando somente o gênero *Phaseolus*, o Brasil é o maior produtor, seguido do México. Entretanto, a produção brasileira de feijão tem sido insuficiente para abastecer o mercado interno, devido à redução na área plantada, da ordem de 35%, nos últimos 17 anos.

O cultivo dessa leguminosa é bastante difundido em todo o território nacional. O feijão é reconhecido como cultura de subsistência em pequenas propriedades, muito embora tenha havido um aumento no interesse de produtores rurais, adotando tecnologias avançadas, incluindo a irrigação e a colheita mecanizada.

Dependendo da região, o plantio de feijão no Brasil é feito ao longo do ano, em três épocas, de tal forma que, em qualquer mês, sempre haverá produção de feijão em algum ponto do país, o que contribui para o abastecimento interno. Considerando todos os gêneros e espécies de feijão a produção mundial de feijão, situou-se em torno de 16,8 milhões de toneladas, ocupando uma área de 23,2 milhões de hectares. Cerca de 65,1% da produção foram oriundos de apenas sete países, sendo a Índia responsável por 15,3% e o Brasil 14,6%. (EMBRAPA, 2003).

1.2.2 Importância nutricional

O feijão presente na dieta brasileira apresenta grande importância em relação ao valor nutricional. Além da alta quantidade de proteínas, o feijão é a melhor fonte vegetal de ferro, sendo valiosa a sua contribuição em casos de deficiência nutricional. É excelente fonte de carboidratos, fibra, apresenta baixo teor de lipídeos, sódio e não contém colesterol, além de possuir vitaminas principalmente do complexo B e minerais. Devido a sua composição o feijão é indicado no tratamento e prevenção de anemia, preenchendo as principais recomendações dietéticas para uma boa saúde, aumentando o consumo de fibras e carboidratos complexos e diminuindo o consumo de lipídios e sódio. As principais instituições internacionais de incentivo e promoção à saúde indicam a ingestão diária de uma ou mais porções de feijão (BRIGIDE, 2002).

1.2.3 Pragas limitantes da cultura do feijão

Os grãos armazenados são seriamente atacados por pragas, que causam sérios prejuízos. Os danos causados pelas pragas na cultura do feijoeiro podem ser observados desde a semeadura até quando os grãos estão secos nas vagens ou mesmo armazenados, e, devido à diversidade de espécies que ocorrem. Praticamente todas estruturas da planta têm se mostrado suscetível às pragas.

Sendo uma planta que apresenta ciclo curto, o feijoeiro pode ser cultivado até duas vezes no mesmo ano agrícola. Em decorrência disso, e da variação estacional nas populações de pragas, condições climáticas, cultivares e prática de cultivo utilizado, os prejuízos à cultura variam nas diferentes épocas de plantio e a cada ano. As pragas

podem ser agrupadas em cinco categorias: pragas do solo, pragas da folhas, pragas das hastes, praga das vagens e pragas de grãos armazenados (QUINTELA, 2002). Dentre estas últimas, se destaca o caruncho do feijão *Zabrotes subfasciatus* (Boh. 1833) um Coleóptero da família Bruchidae (GALLO et al., 2002). Uma lista das principais pragas da cultura do feijoeiro pode ser vista na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais insetos pragas encontrados na cultura do feijoeiro

Fase suscetível	Pragas
Sementes, plântula e raízes.	<i>Delia pratura</i> (Diptera: Anthomiidae) <i>Agrotis ipsilon</i> (Lepdoptera: Noctuidae) <i>Eiasmopalpus lignoselus</i> (Coleoptera: Chrysomelidae) <i>Teratopactus nodicollis</i> (Coleoptera: Curculionidae) <i>Diabrotica esepciosa</i> (Coleoptera: Chrysomelidae) <i>Ceratoma arcuatra</i> (Coleoptera: Chrysomelidae) <i>Cerotoma tingomarianus</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)
Folhas	<i>Diabrotica esepciosa</i> (Coleoptera: Chrysomelidae) <i>Ceratoma arcuatra</i> (Coleoptera: Chrysomelidae) <i>Liriomyzia sp</i> (Díptera: Agromyzidae) <i>Orriodes indicata</i> (Coleoptera: Chrysomelidae) <i>Urbanus proteus</i> (Lepdoptera: Hesperidae) <i>Empoasca kraemeri</i> (Homoptera: cicadellidae) <i>Benusia tabari</i> (Homoptera: Aleyrodidae) <i>Thrips palmi</i> (Thysanoptera: Thripidae) <i>Calio Thrips sp</i> (Thysanoptera: Thripidae) <i>Frankliniella sp</i> (Thysanoptera: Thripidae)
Hastes e axilas	<i>Epinotia aporema</i> (Lepdoptera: Tortricidae) <i>Sternechus subsignatus</i> (Coleoptera: Curculionidae).
Vagens	<i>Thecla jebus</i> (Lepidoptera: Gelechidae) <i>Maruca testulalis</i> (Lepidoptera: Pyraustidae) <i>Etella zinckenella</i> (Lepidoptera: Phycitidae) <i>Heliothis spp</i> (Lepdoptera: Noctuidae)
Grãos armazenados	<i>Zabrotes subfasciatus</i> Coleoptera: Bruchidae <i>Acanthoscelides obtectus</i> Coleoptera: Bruchidae

Fonte: Quintela, 2002

1.3 *Zabrotes subfasciatus* (Boh. 1833)

1.3.1 Classificação e distribuição

O *Zabrotes subfasciatus* (Boh. 1833) é um coleóptero da família Bruchidae conhecido vulgarmente como caruncho do feijão (Figura 1). É uma das principais pragas de grãos armazenados, ocorrendo em todas as regiões do globo onde se faz o

armazenamento de feijão, e principalmente nas regiões tropicais da América Latina, onde aparece com maior frequência (ROSSETO, 1966).

Figura 1 - Adultos de *Zabrotes subfasciatus*



Fonte: Autora, 2005.

O centro de origem de *Z. subfasciatus* é a América Central e do Sul, expandindo-se daí para todo mundo. Sua ocorrência em *Phaseolus vulgaris* L. é comum na África, Sudeste Asiático, Índia e Europa (FERREIRA, 1960). No Brasil, está presente em todos os estados produtores de feijão, sendo registrado principalmente nos estados da Bahia, Amazonas, Espírito Santo, Pará, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo (SILVA et al., 1968).

1.3.2 Biologia

O bruquídeo *Z. subfasciatus* apresenta, na fase adulta, 1,8 a 2,5 mm de comprimento e 1,4 a 1,8 mm de largura e tem coloração castanho-escuro com manchas claras no pronoto fortemente pubescente. O dimorfismo sexual é bem nítido, permitindo a separação dos sexos. As fêmeas são maiores que os machos, além de apresentarem uma mancha clara triangular na parte posterior da cabeça, outra da mesma forma próximo ao escutelo e duas outras nos ângulos do pronoto, enquanto que, nos machos

só é bem distinta a mancha pré-escutelar (Figura 1) (FERREIRA, 1960). Os ovos são ovóides, quase arredondados medindo de 0,46 a 0,60 mm de comprimento e 0,44 a 0,50 mm de largura, ficando fortemente aderidos à superfície do grão. Os ovos férteis são opacos e os ovos inférteis são translúcidos. As larvas são do tipo curculioniforme, com coloração branca-leitosa, dotados de mandíbulas desenvolvidas com as quais são capazes de romper os grãos para alimentação interna. As pupas são maiores que os adultos, da mesma coloração que as larvas, sem pêlos, medindo 2,5 a 3,5 mm de comprimento e 1,5 2,0 mm de largura (FERREIRA, 1960; GALLO et al., 2002) (Figura 2).

Figura 2 - Fases de vida do *Z. subfasciatus*



Fonte: <http://www.centreinar.org.br/pragas/bruchidae.html>. Acesso em: fev. 2004

No estudo da biologia dessa espécie verificou-se que o período de desenvolvimento foi de 36 dias. A longevidade dos adultos de 13,8 dias para machos e 11 dias para fêmeas, estas chegando a produzir 63 ovos (FERREIRA, 1960). A proporção entre sexos é de aproximadamente 1:1 segundo Ferreira (1960); Howe e Currie (1964) e Dendy e Credland (1989).

1.3.3 Danos

O *Z. subfasciatus* ataca exclusivamente o feijão armazenado, e a sua larva do tipo cucurlioniformes passa diretamente do ovo para o interior do feijão e, todo o desenvolvimento se dá dentro nas galerias e câmara pupal construída pela larva. Antes de empupar, a larva opercula um orifício de saída para emergência na fase adulta. O prejuízo causado pela praga está relacionado à redução de peso, depreciação da qualidade e queda do poder germinativo das sementes, causando depreciação comercial, pela presença de insetos adultos, ovos, larvas, pupas, fragmentos e excrementos (GALLO et al., 2002) (Figura 3).

Figura 3 - Grãos de feijões danificados por *Z. subfasciatus*



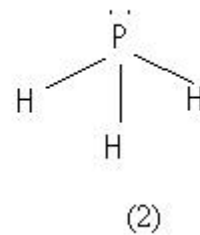
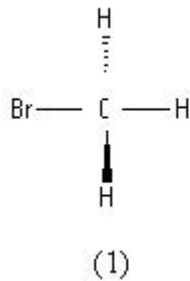
Fonte: [http:// www.centreinar.org.br/ pragas/bruchidae.html](http://www.centreinar.org.br/pragas/bruchidae.html).

1.3.4 Métodos de controle

1.3.4.1 Controle químico

O controle desta praga é feito basicamente pelo emprego de inseticidas químicos. Em virtude de o feijão ser estocado ensacado recomenda-se a fumigação. Os agentes fumigantes atuam diretamente sobre o aparelho respiratório dos insetos e quanto maior o ritmo respiratório mais rapidamente o inseto se intoxicará. Os produtos mais usados para este fim são o brometo de metila (1) e a fosfina (2). No entanto,

apesar de serem eficientes no controle, tais produtos são altamente tóxicos ao homem, sendo responsáveis por inúmeros casos de morte de aplicadores (GALLO et al., 2002). O perigo que os inseticidas representam para o ser humano e para o ambiente, os problemas para sua aplicação e o seu alto custo levaram pesquisadores à procura de métodos mais eficientes e adequados ao controle das pragas. O controle químico pode ser também efetuado com o uso de inseticida em pó aplicado diretamente sobre a massa de grãos, porém não é muito eficiente devido à resistência desses insetos, além dos resíduos químicos deixados sobre os grãos



1.3.4.2 Controle alternativo através do manejo integrado de pragas

A exigência do mercado internacional por produtos isentos de agrotóxicos, fez surgir a necessidade de se trabalhar de forma ecológica e economicamente racional no controle de insetos, o que resultou na adoção de técnicas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), que consiste basicamente na proteção de plantas contra pragas e doenças fazendo uso de soluções alternativas e, em último caso, produtos químicos tóxicos. As pesquisas têm sido direcionadas para o desenvolvimento de estratégias alternativas promissoras que possam ser empregadas em programas de MIP (GALLO et al., 2002).

Para substituir os tratamentos químicos, pequenos produtores têm misturado grãos de feijão com areia, cal, cinza de madeira, resíduos de trilha da colheita (munha), terra de formigueiro, pimenta-do-reino ou óleos e o resultado nem sempre é o melhor (BARBOSA et al., 2002).

A utilização de infoquímicos e em particular dos feromônios, tem se destacado. As pesquisas na área são intensas, abordando várias ordens de insetos, resultando em um grande número de artigos científicos, envolvendo aspectos biológicos, fisiológicos, comportamentais, bioquímicos e genéticos.

1.4 Infoquímicos

Segundo Klopfer e Hatch (1968) a comunicação é parte integrante do comportamento animal e é definida por Lewis e Gower (1980) como a transmissão de sinal ou sinais entre dois ou mais organismos, favorecendo a seleção tanto da produção quanto da recepção do sinal ou sinais.

Os insetos são seres vivos que mais utilizam os odores para desempenhar atividades durante sua existência, visando a localização de presas, defesa, agressividade e seleção de plantas hospedeiras, na escolha de locais para oviposição, na corte e no acasalamento, na organização das atividades sociais dentre outras atividades (KLOPFER; HATCH, 1968).

As substâncias químicas envolvidas na comunicação entre os organismos são denominadas semioquímicos, que significa sinais químicos (NORDLUND; LEWIS, 1976). São eles os infoquímicos, toxinas e hormônios, entre outros. O termo feromônio pode ser definido, então, como substâncias químicas que em seu contexto natural, fornece informações, sobre interação entre dois indivíduos, provocando no receptor, uma resposta comportamental, sendo assim considerado uma subcategoria dos infoquímicos (DICKE; SABELIS, 1988).

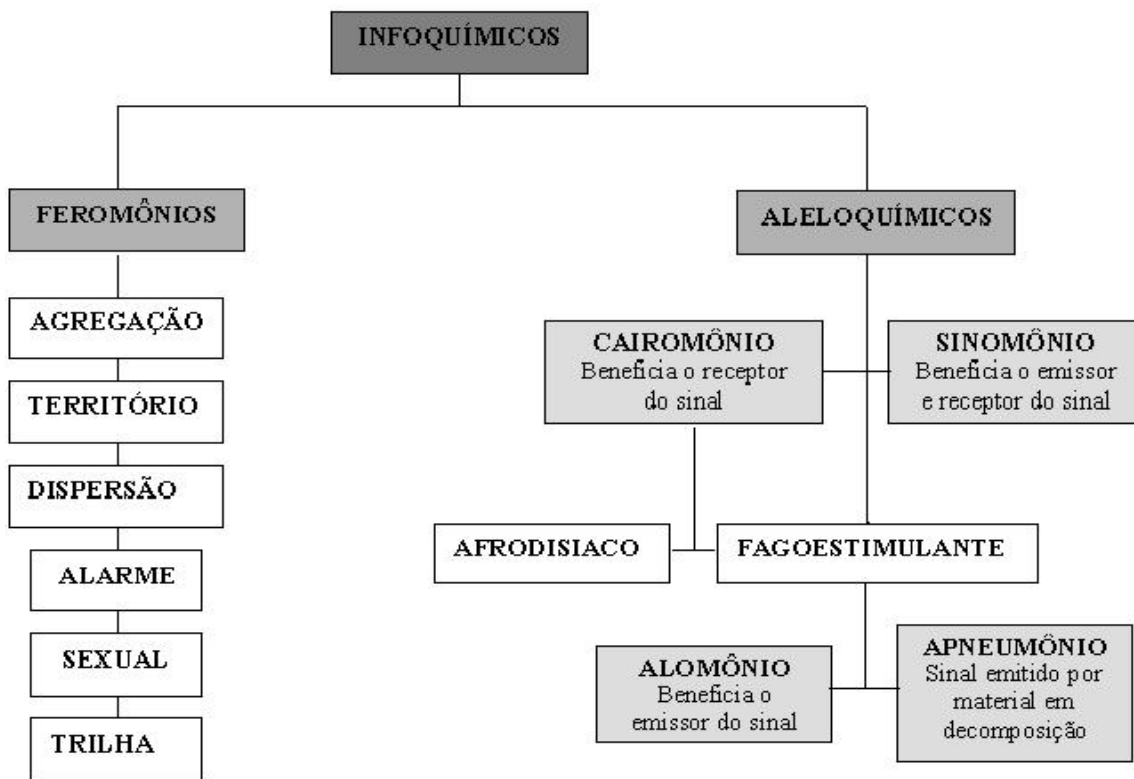
Estas substâncias podem ter ação intraespecíficas (feromônio) ou interespecíficas (aleloquímicos) (BROWN; EISNER; WHITTAKER, 1970; LAW; REGNIER, 1971). Os Feromônio e aleloquímicos são classificados de acordo com o tipo de comportamento que provocam (NORDLUND; LEWIS, 1976).

Os Aleloquímicos, por sua vez diferenciam-se de acordo com o tipo de organismo que está sendo beneficiado na comunicação. Cairomônios são sinais

químicos que quando liberados beneficiam somente o agente receptor, conseqüentemente não favorecendo o emissor, estes sinais são divididos em: afrodisíacos e fagoestimulantes. Alomônios ao contrário, são sinais químicos que favorecem somente ao emissor. Já os sinomônios, favorecem tanto o agente emissor como o receptor de sinal. Cabe salientar a presença dos apneumônios neste grupo de infoquímicos de ação interespecíficas. Estes aleloquímicos são liberados por material em decomposição e atraem principalmente, insetos coprófagos e saprófagos. Os feromônios são considerados substâncias mensageiras entre indivíduos, capazes de alterar completamente o comportamento e a fisiologia dos insetos (DICKE; SABELIS, 1988).

Os feromônios podem agir na fisiologia e no desenvolvimento dos indivíduos quando denominados preparadores de efeito prolongado ou ter efeito desencadeador com ação imediata no comportamento dos indivíduos. Os feromônios de insetos podem ser agrupados de acordo com o tipo de comportamento desencadeado. Alguns feromônios funcionam a longas distâncias enquanto outros atuam a curtas distâncias, no entanto são importantes para estimular o comportamento reprodutivo, agregação em alimentos, defesa, dispersão, territorialidade, oviposição e outros como pode ser visto na Figura 4 (VILLELA; DELLA LUCIA, 1987).

Figura 4 - Classificação dos infoquímicos



Fonte: Mendonça, 1997.

1.4.1 Emprego do uso de feromônio no manejo integrado de pragas

Existem, três alternativas básicas para o emprego dos feromônios: monitoramento e detecção, captura massal e confundimento (VILELA; DELLA LUCIA, 2001; JUTTSUM; GORDON, 1989). O monitoramento através de feromônio sexuais fornece elementos que auxiliam na decisão de quanto, onde e quando aplicar o inseticida (WALL, 1989). A técnica emprega armadilhas contendo quantidade específica de feromônio, para atração de machos ou fêmeas do inseto. Dependendo da quantidade de inseto capturada, decide-se pela aplicação ou não do inseticida.

A captura massal emprega feromônios sexuais ou de agregação. Esta técnica exige o emprego de armadilhas, em número variável por hectare em função da espécie,

e vistorias regulares e tem como base à redução da população do inseto pela coleta (BAKKE; LIE, 1989).

A técnica do confundimento baseia-se na liberação do feromônio, na atmosfera, em concentração mais elevada o que acarreta, como consequência, a quebra da comunicação entre os insetos de modo que estes não encontrarão os parceiros para o acasalamento. O confundimento pode também ser causado pelo uso de um inibidor do feromônio do inseto (CAMPION et al., 1989).

A utilização da coleta massal por meio de armadilhas com feromônios em associação com agrotóxicos ou com fungos entomopatogênicos, tem aumentado o sucesso das coletas massais. O resultado do emprego desta técnica para o controle de Coleóptero, em que ambos os sexos são atraídos, apresenta-se promissor (VILELA; DELLA LUCIA, 1987).

1.4.2 Feromônio de coleópteros pragas de grãos armazenados

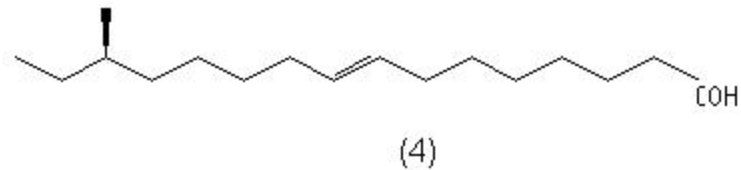
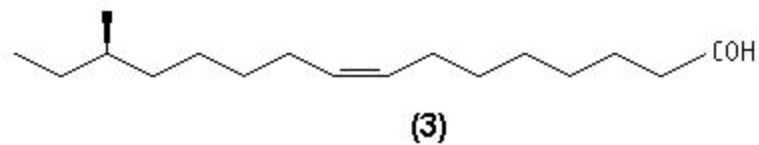
Por milhares de anos os insetos têm sido um problema associado com grãos armazenados, como evidenciado em depósitos arqueológicos (SOLOMON, 1965; BUCKHAND, 1981) e antigos relatos de hieróglifos (LEVINSON; LEVINSON, 1998). Por volta de 25 séculos antes de Cristo os besouros já eram conhecidos como pragas de grãos estocados (LINSLEY, 1944). Este fato está associado com a procura de alimentos, parceiros sexuais, sítios de oviposição e atividades defensivas para proteção de condições ambientais adversas de inimigos naturais.

Por causa da necessidade de proteção desses grãos do ataque de insetos devido aos danos, principalmente a longo prazo, os feromônios detêm considerável importância no manejo de pragas. Até o momento o seu principal uso está concentrado no monitoramento de populações de insetos (COX; COLLINS, 2002).

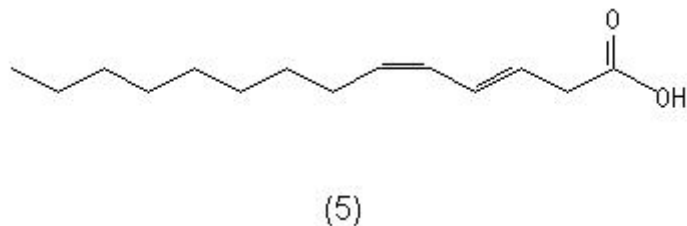
Em espécies que atacam grãos armazenados foram identificados mais de 35 feromônios, nas ordens coleoptera e lepidoptera, sendo compostos bastante voláteis, de baixo peso molecular, e várias estruturas diferentes. O feromônio sexual é produzido

geralmente por coleoptera e lepidoptera das famílias Anobiidae, Bruchidae e Dermestidae. Os adultos destes insetos tendem a ter vida curta e se alimentam pouco, já os feromônios de agregação são produzidos por besouros da família Bostrichidae, Cucujidae, Curculionidae, e Tenebrionidae. Estes insetos se alimentam substancialmente e possuem vida longa (BURKHOLDER, 1990)

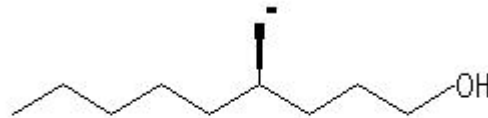
Uma substância produzida por fêmeas do besouro *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) praga de trigo armazenado, foi identificado como (*Z*) (3) ou (*E*)14-metil-8-hexadecenal trogodermal (4), feromônio sexual. Esta substância também foi identificada em outras espécies desse gênero (WOOD et al., 1970).



No entanto o primeiro feromônio de coleópteros pragas de grãos armazenados quimicamente identificado foi o ácido megatômico ácido (3*E*,5*Z*)-3,5- tetradecadienoico (5), o feromônio sexual liberado por fêmeas de *Attagenus megatoma* (Coleoptera: Dermestidae) (SILVERSTEIN et al., 1967).

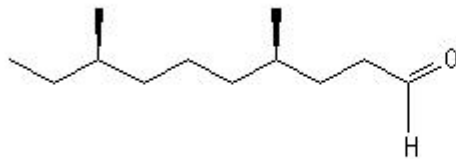


A primeira evidência de feromônio sexual em coleópteros de grãos armazenados foi para *Tenebrio molitor* L. (VALENTINE, 1931) besouro amarelo da farinha. Pesquisadores, trabalhando independente e em épocas diferentes Valentine, (1931); Tschinkel et al. (1967); August (1971), relataram que o comportamento de cópula é mediado por pelo menos quatro compostos incluindo um atraente produzido pela fêmea o qual foi identificado por Tanaka et al. (1986 e 1989) como (*R*)-(+)-4-metil-1-nonanol (6).

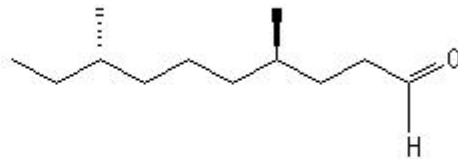


(6)

As espécies *Tribolium* spp depende do ataque de outras pragas para se alimentar nos grãos armazenados, alimentando-se de várias espécies de grãos armazenados tais como: sorgo, trigo e o milho. Neste gênero a liberação do feromônio está relacionada ao inseto macho como observado em: *Tribolium confusum*, *Tribolium castaneum*, *Tribolium brevicornes*, *Tribolium destructor*, *Tribolium audax* e *Tribolium freemani*. O principal componente associado a este gênero é o (4*R*,8*R*)-4,8-dimetildecanal tribolura (7) Posteriormente, bioensaios realizados por Suzuki e Mori revelaram que uma mistura dos isômeros (4*R*,8*R*) (7) e (4*R*,8*S*) (8) na proporção 8:2, foi dez vezes mais ativa que o isômero natural isolado (SUZUKI; MORI, 1993).

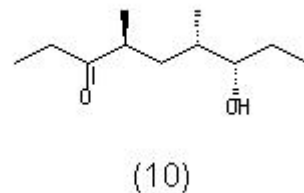
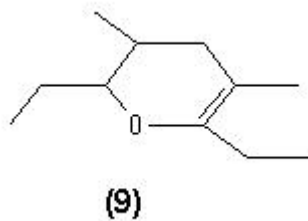


(7)



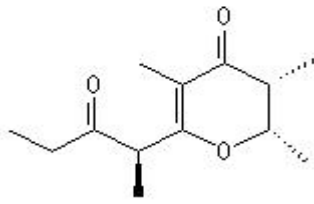
(8)

Lasioderma serricorne (F.) (Coleoptera: Anobiidae) é uma das mais sérias pragas de tabaco armazenado (ASHWORTH, 1993) ocorrendo também em fábricas de processamento de alimentos de animais em casa de rações (MOREIRA et al., 2005). Seu feromônio sexual foi identificado como anidroserricornina (2S,3S)2,6-dietil-3,5-dimetil-3,4-diidro-2H-pirano (9) (LEVINSON; LEVINSON, 1981) e o serricornina (4S,6S,7S) -7-hidroxi-4,6-dimetil-3-nonanona (10) (CHUMAN et al., 1979), o uso do componente anidroserricornin sobre armadilhas adesiva removeu 500.000 besouros machos durante um período de 15 meses em armazéns de tabaco na Grécia (BUCHELOS; LEVINSON, 1993). O uso de armadilhas em armazéns de alimentos no Havaí foi uma alternativa efetiva durante cinco anos no controle de *L. serricorne* (PIERCE, 1999).

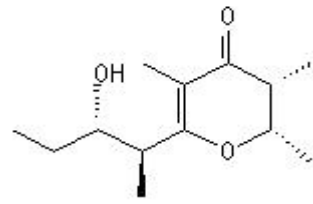


O uso de serricornina e anidrosserricornina foi introduzido no Brasil por Camargo e Melo (1986), e a partir de então vem sendo utilizados no monitoramento e na captura massal de *L. serricorne* em armazéns de fumo.

A espécie *Stegobium paniceum* (Coleoptera: Anobiidae), ocorre em moinhos de grãos, em locais de armazenamento de alimentos e de especiarias. As fêmeas são responsáveis pela liberação do feromônio sexual que foi identificado como (2S,3R,1'R)-2,3-diidro-2,3,5-trimetil-6-(1'-metil-2-oxobutil)-4H-piran-4-ona, também conhecido como estegobinona (11) (KUWAHARA et al., 1978). Posteriormente, Kodama et al., (1987) identificaram um segundo componente feromonal, um álcool análogo identificado como (2S,3R,1'S,2'S)-2,3-diidro-2,3,5-trimetil-6-(2'-hidroxi-1'-metilbutil)-4H-piran-4-ona, estegobiol (12), e constatou-se que este composto opera como atraente sexual á curta distância, enquanto o outro atua a longa distância.

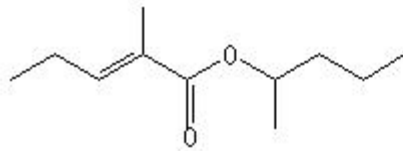


(11)

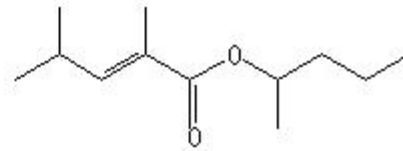


(12)

A principal praga de pós-colheita de trigo no Brasil é a *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) que se alimenta de cevada, arroz e aveia. O feromônio de agregação desta espécie é composto pelos componentes (*E*)-2-metil-2-pentenoato de 1-metilbutila chamado dominicalura 1 (13), e (*E*)-2,4-dimetil-2-pentenoato de 1-metilbutila chamado dominicalura 2 (14), os quais são efetivos individualmente ou em várias combinações (BASHI, 2001).

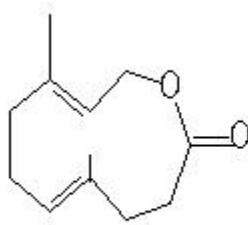


(13)

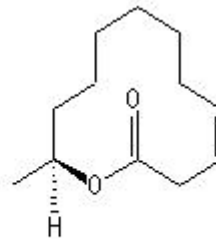


(14)

Cryptolestes spp e *Oryzaephilus spp* (Coleoptera:Cucujidae) são espécies que ocorrem nos restos de grãos e farinhas em armazéns. Algumas espécies do gênero *Cryptolestes* tiveram seus feromônios identificados (MOREIRA et al., 2005). Para *C. ferrugineus*, o feromônio de agregação foi identificado como sendo uma mistura de (4*E*,8*E*)-4,8-dimetil-decadien-10-olida, ferrulactona I (15), e (3*Z*,11*S*)-3-dodecen-11-olida, ferrulactona II (16), as quais atuam de maneira sinérgica. Fêmeas são mais sensíveis a este feromônio (WONG et al., 1983). Foram identificados ainda três componentes do feromônio de agregação de *Cryptolestes pusillus* (*Z*)-3-dodecen-12-olida (17) é o componente majoritário, apresentando atividade quando testado isoladamente. Já o composto (5*Z*,13*S*)-5-tetradecen-13-olida (18) não possui atividade isoladamente, mas apresentou sinérgismo considerável com a lactona (17). A (3*Z*,6*Z*)-3,6-dodecadien-12-olida (19) mostrou se ativa só em altas concentrações (MILLAR et al., 1985).

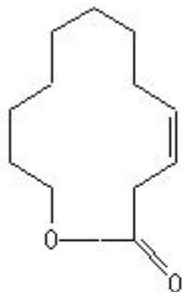


(15)

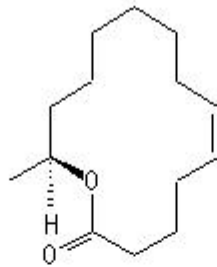


(16)

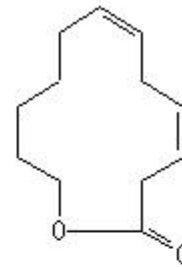
Estruturas de feromônio semelhante ocorrem em espécies do gênero *Oryzephylus* (Coleoptera: Silvanidae). O feromônio de agregação do *Oryzaephilus mercator* é composto por uma mistura (1:1,25) das lactonas (*R*) (19) e (3*Z*,6*Z*,11*R*)-3,6-dodecadien-11-olida (20). Ambos os sexos desta espécie são atraídos para cada composto individualmente (OEHLSCHANGER et al., 1987). Na espécie *Oryzephylus surinamensis*, uma mistura (1:3:1) das lactonas (19), (21) e (22) foi atribuída como feromônio de agregação, sendo necessária a presença dos três componentes para uma efetiva atratividade (PIERCE et al., 1987).



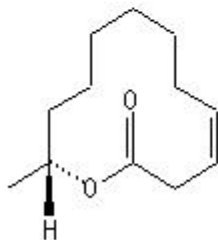
(17)



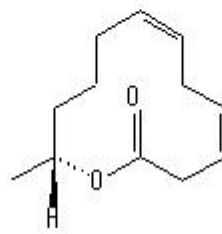
(18)



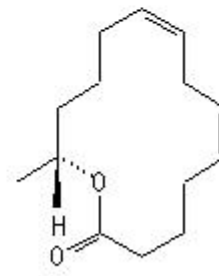
(19)



(20)

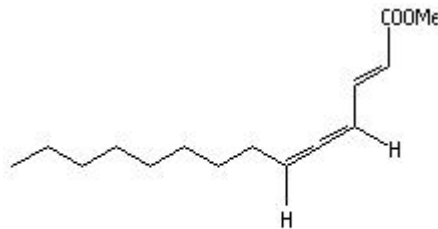


(21)



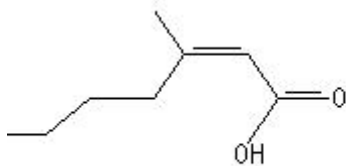
(22)

O inseto *Acanthoscelide obtectus* (Coleoptera:Bruchidae) é uma das pragas do feijão, o macho emite o feromônio sexual, identificado como (*E,Z*)-2,4,5-tetradecatrienoato de metila (23) (HORLER, 1970).

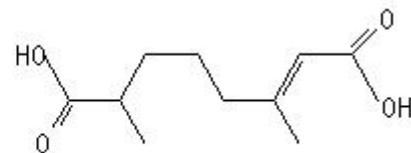


(23)

Feromônios de espécies do gênero *Callosobruchus* (Coleoptera:Bruchidae) também vem sendo descritos. A espécie *C. analis* e *C. maculatus* tiveram seus feromônios identificados como o ácido (*Z*)-3-metil-2-heptenoico (24) (PHILLIPS et al., 1996; CORK et al., 1991). Para *C. chinensis* foi identificado o ácido (*E*)-3,7-dimetil-2-octeno-1,8-dióico (25) (TANAKA et al., 1981).



(24)



(25)

1.5 Técnicas aplicadas ao estudo comportamental de insetos

A comunicação entre os animais é realizada através do uso de sinais visuais, acústicos, táteis e/ou olfativos. Os insetos de uma maneira geral, utilizam todos estes sinais no processo de comunicação; a ênfase dada a cada um deles, no entanto, difere sensivelmente entre as espécies. O principal sinal de comunicação usado por uma determinada espécie está intimamente relacionado com seu habitat, seu comportamento e a interação desta com seu meio ambiente. Apesar de cada um desses sinais terem sua importância para determinada espécie, são os sinais químicos,

de um modo geral, os grandes responsáveis pela comunicação entre insetos e seu meio ambiente (LEWIS, 1984).

O sucesso da reprodução depende da receptividade sexual das fêmeas, que geralmente é seletiva ao macho e só com apropriada estimulação se tornam receptivas. Na maturidade sexual, fêmeas e machos conspecíficos trocam sinais e usam algum tipo de corte (RINGO, 1996). A corte, segundo Richard (1974), consiste principalmente de locomoção e imobilização, movimentos de antenas e asas, incluindo vibração, sendo que esta atua inclusive como estímulo visual, além do componente sonoro.

Segundo Atkins (1980), o comportamento reprodutivo dos insetos pode ser dividido em localização do parceiro, corte, cópula e ovoposição, entretanto, Mathews (1982), considera a localização e o reconhecimento do parceiro como sendo um dos passos no comportamento de corte. A corte é um comportamento que induz a receptividade sexual priorizando a cópula, sendo também uma extensão do fenômeno da comunicação competitiva intraespecífica e que ocasiona a seleção sexual. Muitos insetos são sexualmente dimórficos, usualmente o macho é o que possui adornos como características secundárias, algumas relacionadas com a corte. A elaboração de características associadas com a competição sexual, está ligada diretamente à sobrevivência (GULLAN; CRANSTON, 1994).

O estudo do comportamento reprodutivo entre os insetos pode ser associado ao estudo de sua ecologia química, visando à utilização de Infoquímicos em particular os feromônio, como forma de controle.

1.5.1 Olfatometria

Pesquisas que envolvem componentes químicos modificadores do comportamento de insetos exigem além do isolamento e identificação destes, a realização de testes comportamentais que definem a atividade biológica dos compostos fornecendo dados qualitativos e quantitativos de maneira reprodutível rápida e eficiente. É fundamental que os bioensaios demonstrem informações sobre os mecanismos envolvidos na orientação dos insetos á fonte de odor. Os bioensaios devem otimizar o

período em que o inseto apresenta respostas mais intensas ao estímulo, observando-se o ritmo ou a periodicidade das respostas ajustada aos sinais ambientais, a idade dos indivíduos, o nível de luminosidade, a temperatura e a umidade (EIRAS; MAFRA NETO, 2001).

Para o estudo do comportamento dos insetos a estímulos olfativos, pode se utilizar olfatômetros e túneis-de-vento.

Os olfatômetros proporcionam principalmente aos animais que caminham, a possibilidade de escolha entre duas ou mais fontes de odor. São constituídos de vários tubos ou câmaras, contendo materiais a serem testados, conectados a outros tubos ou câmaras vazias. São instrumentos simples, podendo possuir um fluxo de ar (VIANA, 1992).

Para o estudo do feromônio sexual liberado pelo macho de *Anthonomus grandis*, Hardee et al. (1967) desenvolveram um olfatômetro que consistia de um funil invertido, colado sobre uma placa circular, que, por sua vez, era colada em uma base quadrada, confeccionada em vidro. A placa circular tinha orifícios fechados com rolhas de borracha perfuradas, por onde passavam tubos de vidro que faziam a conexão entre um funil e os frascos, os quais funcionavam como câmaras de opção. O fluxo de ar era promovido por uma bomba de vácuo.

Os túneis-de-vento são definidos como um meio ambiente artificial, com controle do vento, temperatura, umidade e luminosidade. São mais adequados para o estudo do comportamento de insetos a longa e a curta distância da fonte de odor. O túnel de vento pode ser horizontal ou vertical. São basicamente constituídos por um ventilador, filtro de carvão ativado, câmara laminizadora, câmaras de vôo, exaustor, fonte de odor, câmara liberadora de insetos e um reostato (EIRAS; MAFRA NETO, 2001).

1.5.2 Eletroantenografia

A eletroantenografia (EAG) é uma técnica que pode ser bastante útil e eficiente na detecção de substâncias ativas presentes em uma amostra em análise. A técnica do

EAG foi desenvolvida por em 1957 por Schneider, com base no fato de que os receptores das antenas de mariposas são altamente sensíveis e específicos para a percepção dos feromônios sexuais das fêmeas. Assim, a resposta elétrica dessas antenas pode ser medida. Nesta técnica, a antena do inseto é amputada e mantida fixa em solução fisiológica, e em cada uma de suas extremidades é colocado um microeletrodo, acoplado a um amplificador e um registrador. O método consiste em levar a antena por meio de uma corrente de ar de intensidade e duração definidas, a substância a ser testada. A corrente de ar carrega as moléculas para a antena, onde penetrarão na membrana dendrítica, gerando numerosos e lentos potenciais de ação, os quais são registrados (ZARBIN, 2001).

1.6 Técnicas aplicadas a extração, isolamento e identificação de substância voláteis de insetos

1.6.1 Extração

Os principais métodos utilizados para coleta de feromônio são: a aeração (coleta de voláteis) e a extração direta por solvente.

1.6.2 Aeração

Por meio do processo de aeração, todos os voláteis emitidos pelos insetos, o que inclui os feromônios, são coletados. Os compostos são adsorvidos em polímeros especiais como por exemplo: Porapak Q (copolímero de divinilbenzenovinilbenzeno) Tenax (polifenileno oxidado na base de 2,6-difenilbenzeno) e carvão ativo e a dessorção é realizada utilizando-se solventes como diclorometano, hexano e éter etílico com alto grau de pureza. O sistema de aeração utilizado geralmente são de vidros com a entrada adaptada a uma coluna contendo carvão ativo, para que o ar seja filtrado. O fluxo de ar arrasta os voláteis até a extremidade oposta e então é adsorvido no polímero. Após o tempo adequado, interrompe-se o fluxo de ar e o sistema é desconectado. O processo de dessorção dos voláteis deve ser feito utilizando-se uma pequena quantidade de solvente (ZARBIN, 2001).

1.6.3 Extração direta por solvente

A extração por solvente é metodologia mais usada para coleta de feromônio, pois além da praticidade do método, requer um tempo muito menor para obtenção do material do que a aeração. No entanto, utilizando-se deste processo, o material coletado apresentará sempre uma quantidade muito maior de impurezas, como hidrocarbonetos, ácidos graxos e outros. O método se torna bastante vantajoso quando se sabe em qual parte do inseto está localizada a glândula produtora de feromônio, pois desta forma a extração pode ser feita na região específica, diminuindo consideravelmente as impurezas facilitando as análises. Em um processo típico os insetos são submersos em solventes e mantidos por cinco minutos. O extrato é então filtrado e concentrado (ZARBIN, 2001).

1.6.4 Concentração dos extratos

A remoção do solvente é uma das partes mais críticas deste processo. A volatilidade dos compostos, associadas às pequenas quantidades, faz com que as perdas de material sejam freqüentes, diminuindo o rendimento. Para que tais efeitos sejam diminuídos, os extratos obtidos na dessorção ou pela extração por solventes devem ser armazenados em pequenos tubos cônicos que irão facilitar a evaporação. Uma vez armazenados, um leve fluxo de nitrogênio ou argônio deverá ser suavemente passado sobre a superfície do solvente, até que seja atingida a concentração desejada. Para tal um frasco de iguais dimensões, contendo um volume conhecido de solvente, deve ser usado como referência.

A concentração ideal dependerá de cada caso em particular e envolve fatores, como a quantidade de feromônio produzida pelo inseto. No entanto em um primeiro estágio, as amostras podem ser concentradas para “insetos equivalentes” (IE) (ZARBIN, 2001).

1.6.5 Identificação de feromônios

O isolamento e a identificação de feromônios normalmente requer o emprego de uma técnica cromatográfica, seguida por um método espectroscópico ou espectrométrico. Embora, a princípio, um número considerável de métodos encontre-se á disposição, na prática, este número é reduzido devido á quantidade excessivamente pequena de material produzido e liberado pelo inseto. A técnica mais utilizada é a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) (ZARBIN, 2001).

1.6.5.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

O isolamento e a identificação do feromônio é feito através da cromatografia gasosa e a análise dos espectros de massa. Apenas uma pequena quantidade do material é requerida para análise, sendo que as informações obtidas são fundamentais para a determinação estrutural da molécula. O fato de o equipamento utilizado estar acoplado a um cromatografo a gás faz com que os espectros adquiridos sejam referentes a compostos quimicamente puros. Na identificação de feromônios, os métodos freqüentemente empregados para ionizar e fragmentar os compostos são ionização química (IC) e ionização por impacto eletrônico (IE). Esta combinação de técnicas mostra-se extremamente eficiente, pois, se para um determinado espectro o pico molecular não for registrado ou aparecer muito fraco, a IC é empregada para a determinação do correto peso molecular do composto, ao passo que a IE fornece muito mais informações a respeito da estrutura, em função de apresentar um número maior de fragmentações (ZARBIN, 2001).

1.6.5.2 Cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia

Utilizando-se desta técnica, através de uma simples análise de extrato bruto, pode se determinar, com total precisão, qual fração foi ativa. A amostra, ao ser injetada, irá percorrer toda a coluna para que haja separação dos compostos. Ao final da corrida, o fluxo que está saindo da coluna é dividido (split) em dois, sendo que uma parte vai para o FID (Detector de Ionização de Chamas) e, conseqüentemente, o cromatograma é traçado e outra parte vai para o EAD, onde a resposta da antena é amplificada. Em

funções de ambas as detecções serem simultâneas, é possível saber se os compostos registrados pelo FID são ou não ativos (ZARBIN, 2001).

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo Geral

Estudar o comportamento reprodutivo, a comunicação intra e interespecífica do *Z. subfasciatus* e identificar os constituintes presentes nos extratos de machos e fêmeas dessa espécie.

1.7.2 Objetivos Específicos

- 1 - Realizar estudos de comportamento de corte e acasalamento *Z. subfasciatus*.
- 2 - Realizar bioensaios comportamentais a fim de elucidar a comunicação intra e interespecífica entre adultos de *Z. subfasciatus* e a planta hospedeira *P. vulgaris*.
- 3 - Extrair pela técnica de aeração os voláteis liberados pelos insetos e que possam ser usados na sua comunicação.
- 4- Realizar bioensaios comportamentais a fim de se comprovar a atividade biológica dos extratos obtidos da aeração.
- 5- Realizar testes eletroantenográficos (EAG) com extratos obtidos da aeração a fim de se comprovar atividade biológica.
- 6- Identificar pela técnica de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS) os constituintes dos extratos de machos e fêmeas de *Z. subfasciatus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos insetos

Os insetos foram coletados de grãos de feijões armazenados no mercado da produção em Maceió. Estes foram colocados em potes plásticos de 500mL, cuja tampa recebeu pequenos furos, a fim de facilitar as trocas gasosas (Figura 5). Os insetos foram mantidos sob condições de Temperatura e Umidade relativa controladas ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$; $70\pm 5\%\text{UR}$), no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais, setor de Biocidas, do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas.

Figura 5 - Colônia de *Zabrotes subfasciatus*



Fonte: Autora, 2005

2.2 Manutenção das colônias

Diariamente, os feijões eram peneirados com peneira de 4 ABNT, a fim de se separar os adultos recém emergidos que eram transferidos para pote plástico de 500mL, contendo 200 g de feijões sadios infestação. A cada dois dias estes insetos adultos eram transferidos para novos potes contendo feijão sem infestação, deste modo se ampliaram à colônia. Após 20 vinte dias de cada infestação, quando começou a

emergência de insetos, os adultos recém obtidos foram coletados, sexados e colocados separados em potes de 300 mL contendo feijão sadio.

2.3 Bioensaios comportamentais de acasalamento

Os bioensaios foram conduzidos em condições de laboratório, com temperatura e umidade controladas ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$; $70\pm 5\%\text{UR}$). A arena de observação constou de placas de Petri de acrílico de 7,0 cm de diâmetro coberta por filme de plástico (Figura 6). Foram realizados dois tipos de bioensaios. No primeiro, avaliou-se a seqüência comportamental da corte e cópula de adultos de *Z. subfasciatus*. Para tanto, cinquenta casais virgens foram colocados, individualizados, em placas de Petri de acrílico transparente, forrada com papel de filtro e coberta por filme de plástico. O tempo de observação de cada casal foi de 40 minutos ininterruptos e todas as posturas comportamentais exercidas pelos insetos foram registradas.

No segundo tipo de bioensaios avaliou-se o comportamento de acasalamento nas diferentes proporções sexuais, definidas abaixo:

- Uma fêmea para um macho (Proporção=1);
- Uma fêmea para dois machos (Proporção =0,5);
- Duas fêmeas para um macho (Proporção =2);
- Duas fêmeas para dois machos (Proporção =1);
- Cinco fêmeas para um macho (Proporção =5);
- Uma fêmea para cinco machos (Proporção =0,2)

Cada tratamento foi composto de 10 repetições. As observações foram realizadas durante 40 minutos cada e os comportamentos observados de forma continua.

Figura 6 - Placas de Petri usadas como arenas de observação de casais de *Z. subfasciatus*



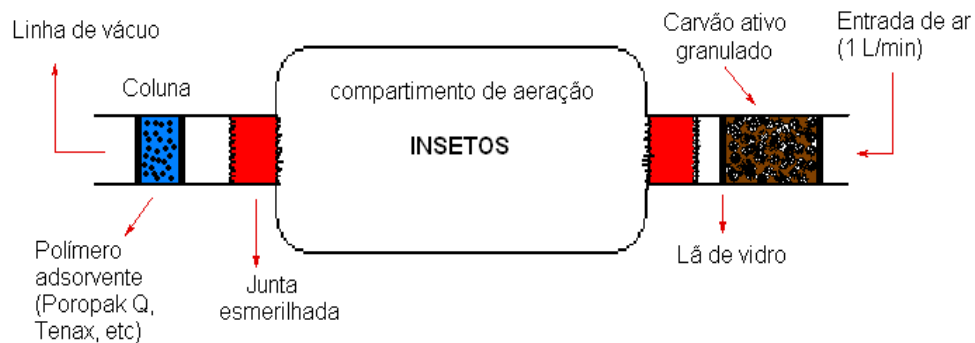
Fonte: Autora, 2005

2.4 Extração de infoquímicos

2.4.1 Sistema de aeração

A técnica de aeração utilizada foi descrita por Mendonça (1995) e Zarbin et al., (1999). O sistema de aeração (Figura 7) foi formado por um pequeno compressor, tipo bomba de aquário, que impulsionava o ar através de um filtro de carvão ativado granulado (Darco®, de 20 a 40 mesh, Aldrich). A seguir o ar purificado passava por um borbulhador, a fim de umedecê-lo, entrando simultaneamente, em duas câmaras de aeração constituídas com tubos vidrolex 24/40 cm, onde os insetos foram colocados para a coleta dos voláteis. Os voláteis liberados, eram arrastados pela corrente de ar purificada e umedecida, e ficavam adsorvidos em um coletor de feromônio, confeccionado com carvão ativado granulado ou tenax e lã de vidro, localizado na saída da câmara.

Figura 7 - Sistema empregado na coleta de voláteis de *Z. subfasciatus*.



Fonte: Mendonça, 1996.

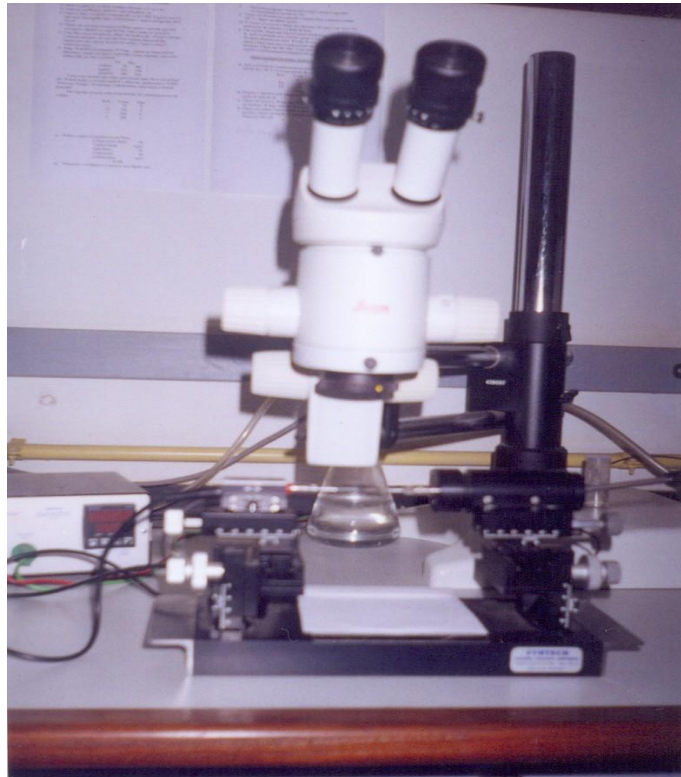
2.4.2 Obtenção de infoquímicos

Dentro de cada câmara eram colocados cerca de 1000 insetos de sexos separados, 200g de feijão, 1000 insetos (macho ou fêmea) + 200g de feijão ou a câmara vazia. O sistema foi vedado, ligado e desligado após 24 h. Os coletores foram eluídos com 4,0 mL de hexano (grau HPLC) e 4,0 mL de diclorometano (grau PA). Os extratos obtidos foram concentrados em nitrogênio gasoso a um volume final de 1 mL, etiquetados e conservados sob refrigeração a 4° C. Todas as conexões eram vedadas com fitas de "teflon", para evitar a perda dos voláteis ou a entrada de contaminantes no sistema. Toda as vidrarias empregadas nas extrações eram lavadas, em seqüência, com detergente neutro e água destilada, depois com etanol e clorofórmio e, finalmente, levada à estufa a 100°C por uma hora. Todas as conexões usadas no sistema de aeração eram limpas de modo semelhante, exceto serem secas em estufa. Evitando, desse modo, qualquer tipo de contaminação dos extratos.

2.5 Eletroantenografia

Os testes eletroantenográficos foram conduzidos na Universidade Federal de Viçosa, MG, no laboratório de feromônio de insetos. O eletroanténógrafo da marca Syntech usado, era composto basicamente de dois eletrodos, um pré-amplificador e um computador para registro dos sinais (Figura 8).

Figura 8 - Eletroantenógrafo utilizado nos testes de eletroantenografia



Fonte: Autora, 2005.

A princípio, os insetos foram imobilizados a uma temperatura de -10°C durante 2 minutos, para retirada da antena com auxílio de bisturi e microscópio estereoscópico. A antena retirada teve sua extremidade distal cortada e em seguida colocada em tubos capilares preenchidos com solução fisiológica tampão salina fosfato PBS. Um capilar com a extremidade basal da antena foi colocado no eletrodo neutro enquanto o outro com a extremidade distal da antena foi colocado no eletrodo registrador. Os dois capilares foram alinhados e conectados, assim a antena ficou entre os dois capilares gerando uma diferença de potencial (ddp). A diferença de potencial elétrico gerado (ddp) foi amplificada e os sinais registrados por meio do programa synthec EAG 2000. Os estímulos aplicados são citados na Tabela 2.

Tabela 2 - Insetos testados e tratamentos utilizados em testes de eletroanatenografia.

INSETOS TESTADOS	TRATAMENTOS
Macho ou fêmea	Branco (ar)
Macho ou fêmea	Fêmeas vivas
Macho ou fêmea	Machos vivos
Macho ou fêmea	Diclorometano
Macho ou fêmea	Extrato Fêmea
Macho ou fêmea	Extrato fêmea + feijão
Macho ou fêmea	Extrato Macho
Macho ou fêmea	Extrato Macho + feijão
Macho ou fêmea	Extrato Feijão
Macho ou fêmea	Aeração controle

Fonte: Autora, 2005.

2.6 Bioensaios comportamentais em olfatômetro

2.6.1 Confeção do olfatômetro

O olfatômetro em “Y” de dupla escolha utilizado foi confeccionado na Oficina de Hialotecnia do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas. Consta de um tubo de vidro de 8 cm de diâmetro, tendo a base do “Y” 30 cm de comprimento e os prolongamentos do “Y” 20 cm, estes possuíam um estrangulamento a fim de impedir a fuga dos insetos testados, cada um dos prolongamentos do “Y” se conectava a uma câmara-teste, onde eram colocados os tratamentos. Estas câmaras, por sua vez, se conectavam a um tubo em “Y” invertido por onde uma corrente de ar purificado com o auxílio de um compressor, do tipo bombinha de aquário. Os insetos testados eram liberados no início da base do olfatômetro “Y” (Figura 9)

2.6.2 Bioensaio em olfatômetro

Os Bioensaios foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN), do Departamento de Química da UFAL, em sala com Temperatura e

Umidade relativa controladas (25° C; 75±5%UR). Cada repetição constou de 5 insetos adultos de idade conhecida submetidos a diferentes combinações de insetos testados e tratamentos, em um total de 10 repetições cada. Os insetos testados eram separados por sexo e liberados na base do tubo em “Y”. Nas câmaras testes eram colocados os tratamentos. Foram conduzidos três grupos de bioensaios.

O primeiro grupo de bioensaios, foi para avaliação da comunicação intraespecífica de *Z. subfasciatus* e pode ser visto na Tabela 3.

Tabela 3 - Insetos testados e tratamentos utilizados no primeiro grupo de bioensaios no olfatômetro.

INSETOS TESTADOS	TRATAMENTO	CONTROLE
Machos (1-3 dias)	Machos (1-3 dias) ou Fêmeas (1-3 dias)	Branco
Machos (4-6 dias)	Machos (4-6 dias) ou Fêmeas (4-6 dias)	Branco
Machos (1,2,3,4,5,6 dias)	Machos (1,2,3,4,5,6 dias) ou Fêmeas (1,2,3,4,5,6 dias)	Branco
Fêmeas (1-3 dias)	Fêmeas (1-3 dias) ou Machos (1-3 dias)	Branco
Fêmeas (4-6 dias)	Fêmeas (4-6 dias) ou Machos (4-6 dias)	Branco
Fêmeas (1,2,3,4,5,6 dias)	Fêmeas (1,2,3,4,5,6 dias) ou Machos (1,2,3,4,5,6 dias)	Branco

Fonte: Autora, 2005.

O segundo grupo de bioensaio, foi para avaliação do efeito sinérgico entre o inseto *Z. subfasciatus* e a planta hospedeira *P. vulgaris* e pode ser visto na Tabela 4.

Tabela 4 - Insetos testados e tratamentos utilizados no segundo grupo de bioensaios no olfatômetro.

INSETOS TESTADOS	TRATAMENTOS	CONTROLE
Machos	Fêmeas + feijão	Feijão
Machos	Fêmeas + feijão	Branco
Machos	Feijão	Branco
Machos	Fêmea	Feijão
Machos	Fêmea	Branco

Fonte: Autora, 2005.

O terceiro grupo foi para avaliar a atratividade dos extratos de machos e fêmeas de *Z. subfasciatus* feitos a partir de aeração, utilizando como solventes diclorometano e hexano e pode ser visto na Tabela 5

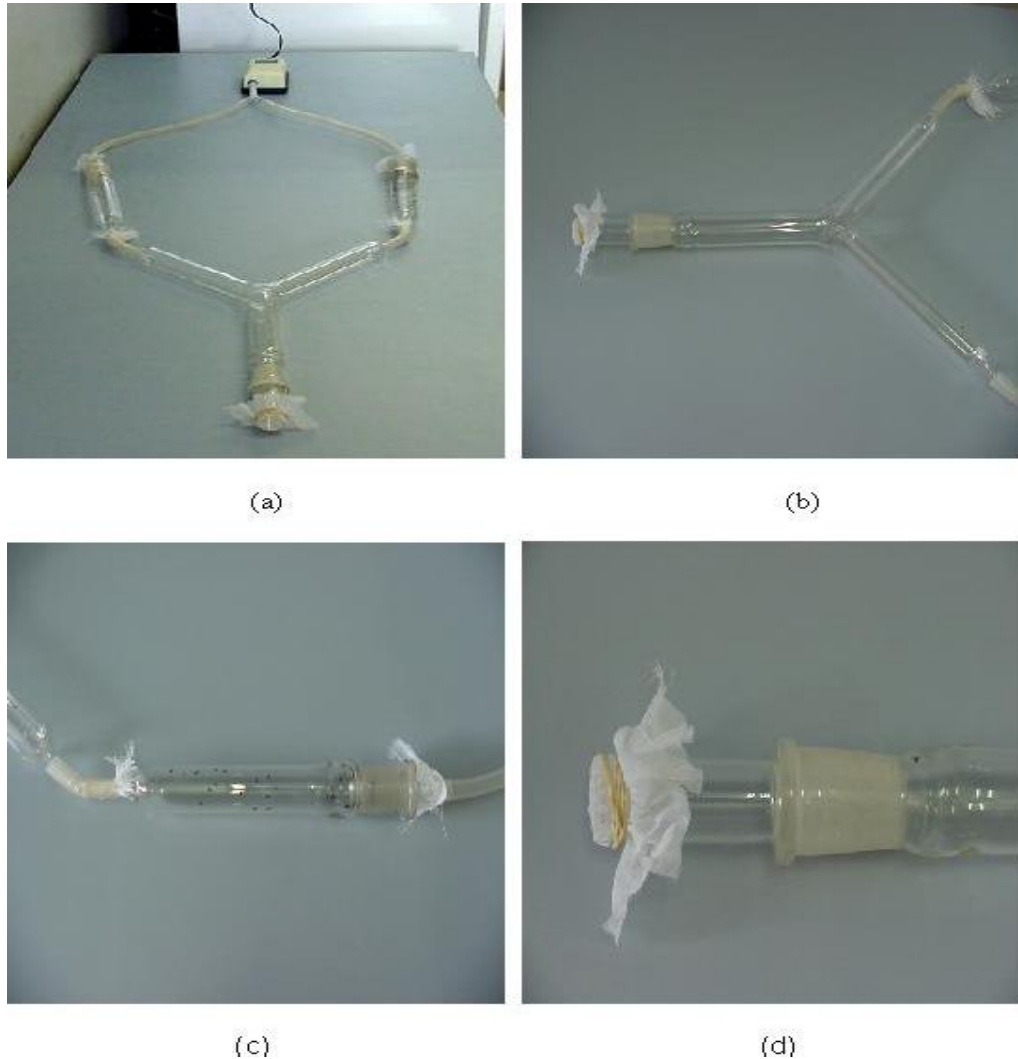
Tabela 5 - Insetos testados e tratamentos utilizados no terceiro grupo de bioensaios no olfatômetro.

INSETOS TESTADOS	TRATAMENTOS	CONTROLE
Machos	Extrato de fêmeas (Diclorometano)	Diclorometano
Machos	Extrato de fêmeas (Hexano)	Hexano

Fonte: Autora, 2005

Antes da realização dos bioensaios foi feito um teste de fumaça, utilizando ácido clorídrico e hidróxido de amônia, que reagiram (reação de neutralização) produzindo uma fumaça branca que, em contraste com um fundo negro, permitiu a visualização da pluma de odor a fim de calibrar a velocidade do fluxo de ar. Em todos os bioensaios, a posição das câmaras-teste era alterada, de modo a evitar o processo de habituação dos insetos. Os tratamentos eram colocados nas câmaras-teste, e em seguida a câmara com os insetos era inserida na base do tubo em “Y”, passando dois minutos, para aclimação dos insetos, o compressor era ligado, iniciando assim o bioensaio, que terminava, após ter decorrido 10 minutos.

Figura 9 - Olfatômetro em “Y” usado nos estudo da ecologia química de *Zabrotes subfasciatus*. (a) olfatômetro (b) “Y” (c) Câmara-teste para tratamento (d) Base do olfatômetro



Fonte: Autora, 2005.

A corrente de ar produzida pelo compressor de ar, passava pelas câmaras-teste e controle arrastando possíveis odores, que eram liberados pelos insetos, até a base do “Y” onde estavam os insetos, que caminhavam em direção a fonte de odor e podiam optar por um dos tratamentos. Os números de visitas feitas pelos insetos até as câmaras-testes foram anotados durante as observações.

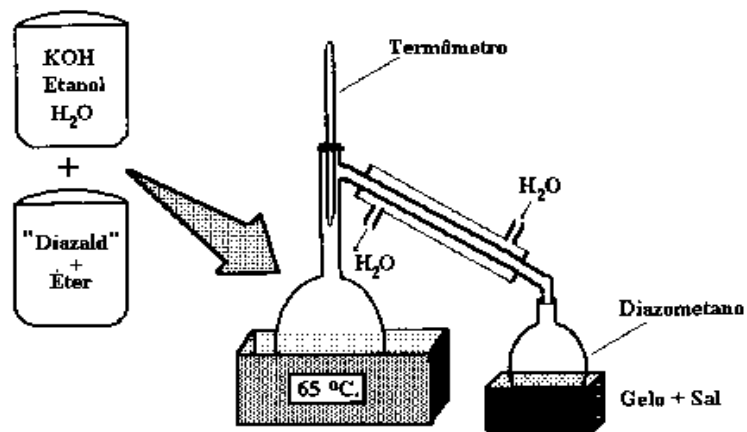
2.7 Isolamento e identificação de constituintes químicos presentes em extratos de *Zabrotes subfasciatus* resultantes de aeração

2.7.1 Preparação do diazometano

O diazometano foi preparado para conversão de possíveis ácidos carboxílicos presentes nos extratos de fêmeas e machos de *Z. subfasciatus* em ésteres metílicos (metilação). Os ésteres são mais apolares e mais voláteis que os ácidos carboxílicos facilitando as análises dos extratos no cromatografo gasoso.

O sistema foi montado de acordo com a Figura 10.

Figura 10 - Sistema utilizado na preparação do diazometano



Fonte: Mendonça, 1996.

Foram preparadas separadamente as seguintes soluções:

- **SOLUÇÃO A**

Em um erlenmeyer de 50 mL, submerso em banho de gelo dissolveu-se 125g de hidróxido de potássio em 20 mL de água destilada e posteriormente, adicionou-se 6,25 mL de etanol.

- **SOLUÇÃO B**

Em uma ampola de decantação de 250 mL submersa em banho de gelo, dissolveu-se 5,35 g de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-tolueno-sulfonamida (Diazald), em 50 mL de éter etílico anidro.

A solução A foi adicionada ao balão de destilação através do funil de decantação, e aquecida em banho maria . A solução B foi adicionada lentamente e a destilação continuou até o éter ser destilado.

2.7.2 Metilação do extrato

Ao extrato foram adicionadas 3 gotas de diazometano. A mistura permaneceu em repouso 20 minutos antes de ser injetado no aparelho de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa GC-MS.

2.7.3 Cromatografia gasosa acoplada á espectrometria de massa (CG-EM)

Utilizou-se de um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-17^A, equipado com uma coluna DB-1, série US 1336783h, com 30 m de comprimento, 0,25 μm de espessura e 0,25 mm de diâmetro interno. O gás de arraste foi hélio (He) a um fluxo de 1 mL min^{-1} e pressão de 50 Kpa. A temperatura inicial foi de 35° C com aumento de 5° C por minuto, com fluxo total de 12,3 mL/ min e fluxo de corrida 12,3 mL/ min. A temperatura do injetor foi de 180°C e da interface 310° C. O modo de controle da injeção utilizado foi o splitless, sem divisão da amostra. A espectrometria de massas foi realizada em um aparelho Shimadzu, modelo GCMS-QP5050A acoplado ao cromatógrafo gasoso (Figura 11). Foram obtidos os espectros de massas por ionização por impacto eletrônico (IE) a 70 eV .

Figura 11 - Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa utilizado nas análises dos extratos de machos e fêmeas de *Z. subfasciatus*



Fonte: Autora, 2005.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo do comportamento de acasalamento do caruncho do feijão *Zabrotes subfasciatus* (BOH. 1833) (COLEOPTERA: BRUCHIDAE)

3.1.1 Bioensaios para análise da sequencia de corte e cópula de *Zabrotes subfasciatus*

Observou-se que o comportamento de corte e de cópula de *Z. subfasciatus* não é muito elaborado, como observado em *Callosobruchus maculatus* (RUP, 1986) e *Cosmopolites sordidus* (VIANA, 1992) mas pode ser dividido em três fases distintas: a pré-copulatória, também chamada de corte; copulatória; e a pós-copulatória.

Nos experimentos realizados na arena, os insetos caminhavam pela arena explorando o novo ambiente, ocorrendo períodos de imobilidade (Figura 12 a). Em geral, os machos eram mais ativos, enquanto as fêmeas ficavam a maior parte do tempo imóvel. A fase pré-copulatória pode ser dividida em duas etapas. A etapa inicial da corte, é caracterizada pelo comportamento de antenação e movimentação em direção à fêmea, indicando que pode ser guiada por substância produzida e liberada por elas, visto que em nenhum momento estas se deslocaram em direção aos machos, sugerindo que as fêmeas sejam responsáveis pela liberação de feromônio sexual.

A segunda etapa da fase pré-copulatória, inicia quando o macho encontra a fêmea e toca com suas antenas e patas protorácicas, o corpo da parceira e tenta a monta. Tais atitudes, envolvem sinais tácteis e visuais, ambos de grande importância no reconhecimento específico à curta distância.

Os machos ao encontrarem as fêmeas tentavam a monta a partir da extremidade posterior (Figura 12 b). Às vezes sem sucesso, pois as fêmeas se esquivavam do assédio dos machos, obrigando-os a desistirem ou reiniciarem a seqüência. As fêmeas foram seletivas na escolha dos parceiros. Nos machos, ao contrário, praticamente não se observou este comportamento. A resposta negativa das fêmeas pode variar desde uma simples recusa, esquivando do assédio dos machos,

assumindo uma postura que dificulte a cópula, até uma atitude defensiva contra àqueles que relutarem em continuar o assédio.

Durante a cópula (Figura 12 c) os machos de *Z. subfasciatus* realizavam movimentos rítmicos com as pernas protorácicas sobre o dorso das fêmeas. Alguns machos efetuaram movimentos com as antenas sobre o dorso das fêmeas, o que pode estar relacionado com a tentativa de obter a aceitação e imobilidade da fêmea

Na fase pós-copulatória, os insetos permaneceram parados na maioria das vezes (Figura 12 d), embora alguns machos tentassem novas cópulas, porém sem sucesso e algumas fêmeas movimentaram as pernas protorácicas sobre a própria superfície dorso-lateral. O final desta fase foi sempre iniciado pelas fêmeas, que com o intuito de desvencilhar dos machos os arrastavam sobre o seu dorso, chegando até a afasta-los com suas pernas metatorácicas. O tempo médio de cópula foi de 20,1 minutos. A Figura 13 representa um etograma de comportamento onde aparece toda seqüência de corte e cópula do *Z. subfasciatus*.

Foram observados que o *Z. subfasciatus* apresentam diferença morfológica quanto às cerdas. Fêmeas por sua vez possuem cerdas ramificadas e mais volumosas enquanto machos exibem cerdas filiformes o que pode influenciar na orientação da monta (Figura 14 e 15). Fato semelhante foi observado por Ward (1981) no estudo com *Stegobium paniceum*, para o qual a orientação da monta advém da presença de cerdas na superfície dorsal das fêmeas

Figura 12 - (a) macho e fêmea *Z. subfasciatus* (b) macho tentando a monta sobre a fêmea (c) cópula (d) macho e fêmea parados após a cópula.



(a)



(b)



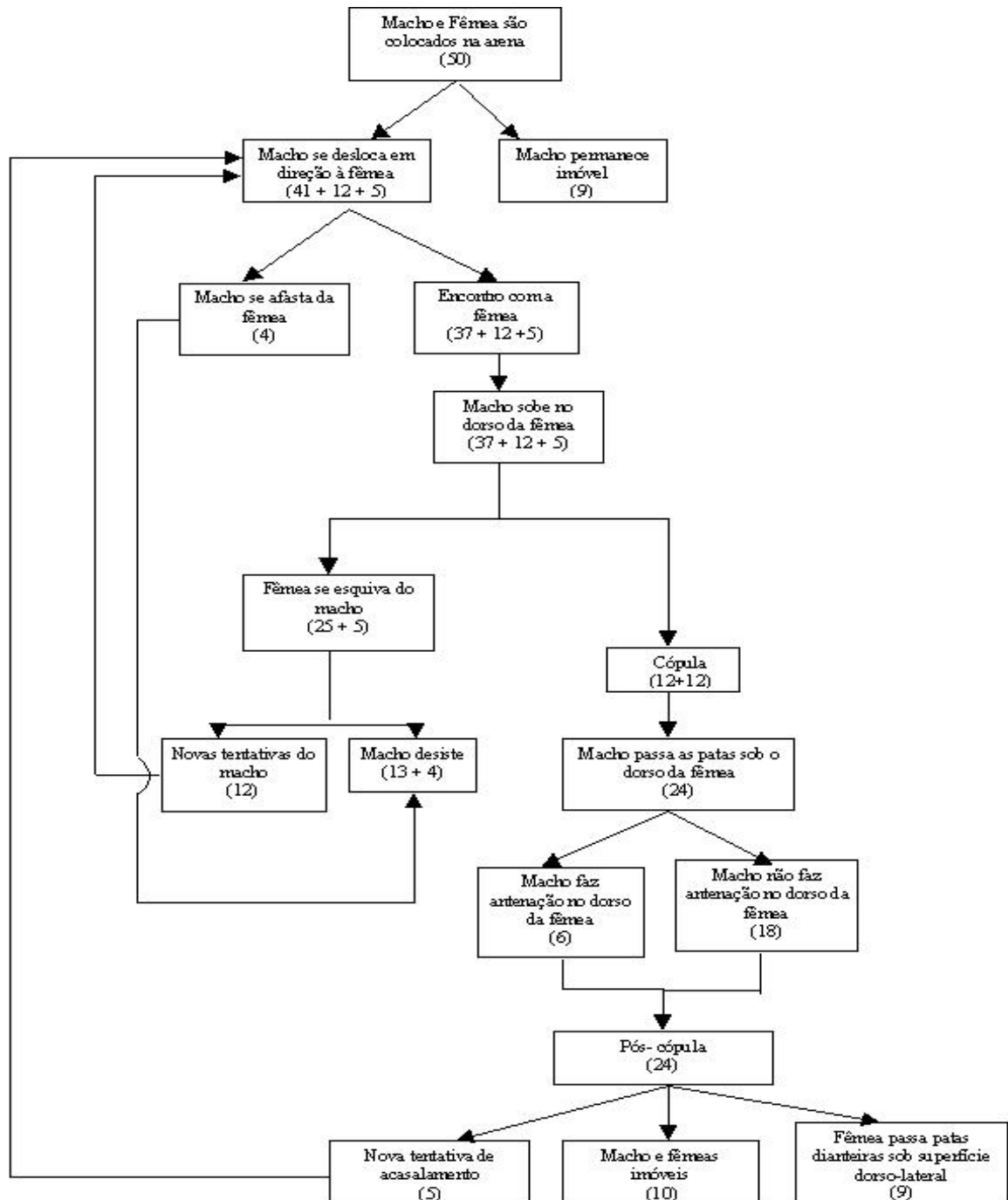
(c)



(d)

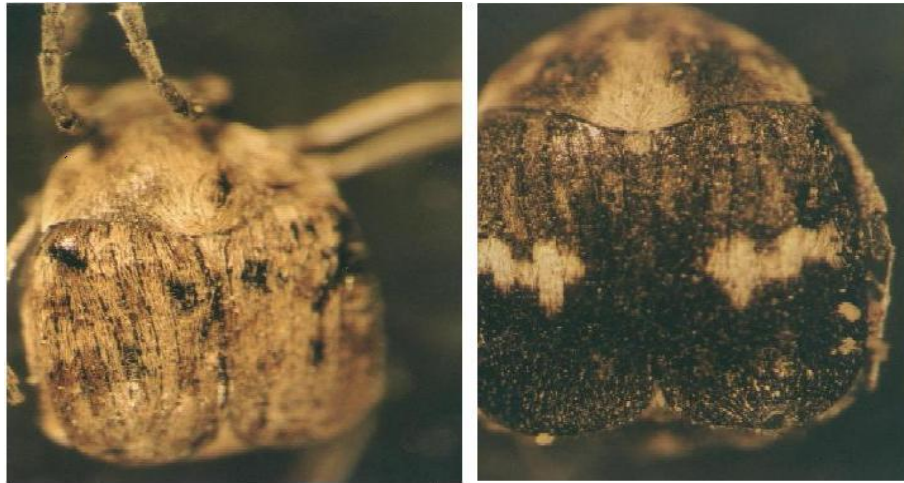
Fonte: Autora, 2005.

Figura 13 - Etograma do comportamento de corte e cópula de adultos de *Z. subfasciatus*.



Fonte: Autora, 2005.

Figura 14 - Vista dorsal de *Z. subfasciatus* (a) macho (b) fêmea

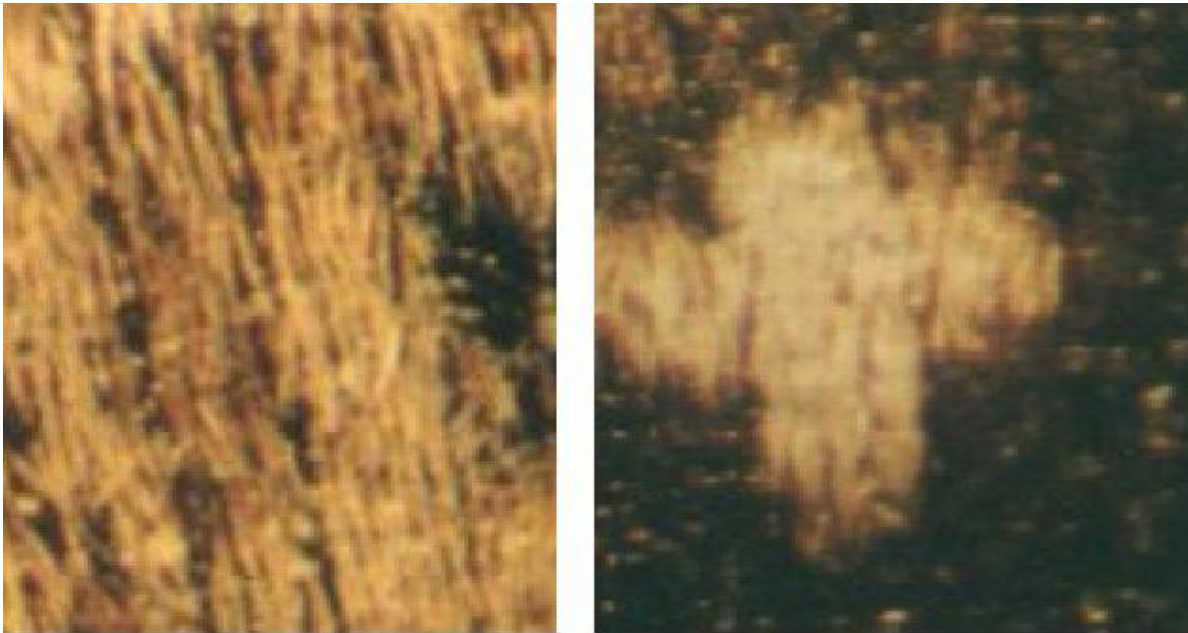


(a)

(b)

Fonte: Autora, 2005

Figura 15 - Cerdas dorsais de *Z. subfasciatus* em destaque (a) macho (b) fêmea.



(a)

(b)

Fonte: Autora, 2005.

3.1.2 Bioensaio para análise do comportamento seletivo da fêmea em relação ao parceiro

Quando foram colocados em uma arena 5 machos e 1 fêmea, observou-se que os machos tentavam impedir ou dificultar a cópula de outros machos, muitas vezes subindo no dorso da fêmea para impedir a cópula quando está já havia iniciado, o que dificultava o acasalamento. Ao diminuir a razão sexual para 2 machos e 1 fêmea ocorre o mesmo fenômeno de disputa pela fêmea, impedindo o acasalamento.

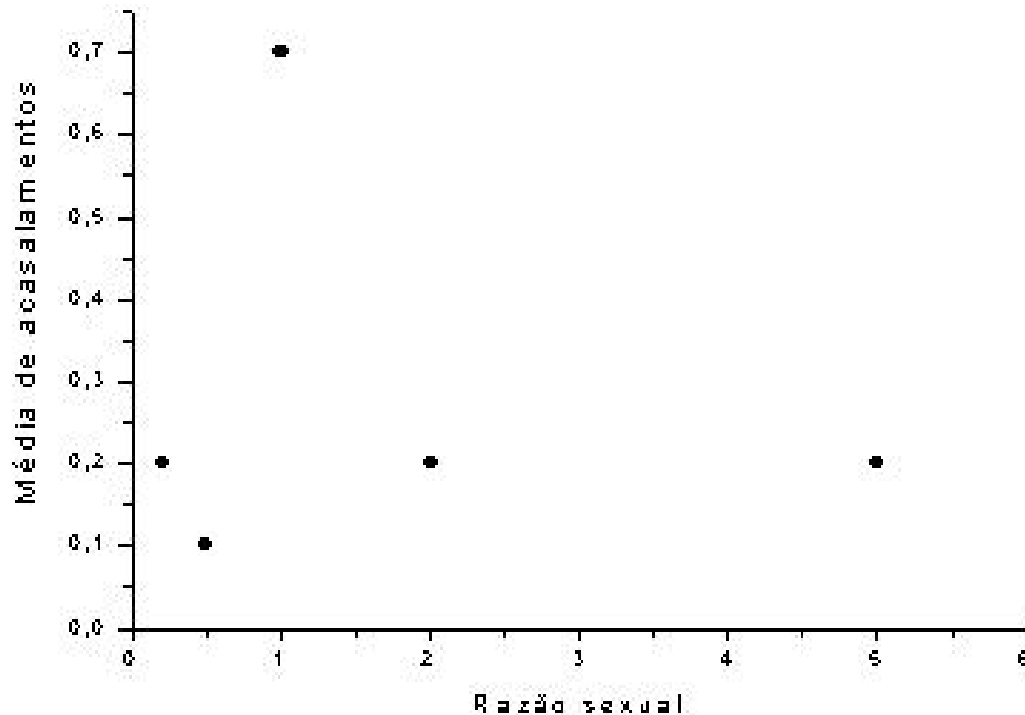
As fêmeas agiram de maneira seletiva na escolha do parceiro, permitindo se acasalar apenas com 1, durante o período observado, não aceitando a corte de um segundo parceiro, ou seja, ela não mais acasala logo após a cópula. Foi observada nesta espécie a poligamia natural dos machos, que chegaram a acasalar quatro vezes em seguida com fêmeas diferentes durante o período observado.

Comportamento semelhante foi observado para *Callosobruchus maculatus* (F.). (RUP, 1986).

Ao se introduzir cinco fêmeas e um macho na arena não foi observado nenhum tipo de comportamento agressivo ou de hostilidade entre as mesmas, não havendo, portanto, tentativa de impedimento de cópula pela fêmea, porém, o número de cópulas não foi significativamente maior ao observado na proporção sexual 0,2. Quando a proporção sexual foi igual 1, não se observou alteração no comportamento de corte e cópula.

Quando a proporção sexual para machos é de 1:1 o número de acasalamento também aumenta, já quando há alteração na razão, seja diminuindo ou aumentando temos diminuição no número de acasalamento. Isso se deve talvez a competição dos machos pela fêmea (Figura 16).

Figura 16 - Número de acasamentos bem sucedido sob diferentes razões sexuais entre adultos de *Z. subfasciatus*.



Fonte: Autora, 2005.

Segundo Krebs e Davies 1996 somente quando a proporção sexual é de 1:1 o sucesso esperado de um macho e de uma fêmea torna-se igual e há estabilidade na população. A combinação entre o investimento maior em fêmeas do que em machos e a proporção sexual de 1:1 na população faz com que geralmente os machos entrem em competição pelas fêmeas. O lucro em potencial com sucesso de um macho é alto, de modo que a capacidade do macho adquirir parceiras está sob forte pressão seletiva. Geralmente a seleção de caracteres relacionados apenas com aumento do sucesso do acasalamento é denominada de seleção sexual, ou seja durante a corte a fêmea é mais seletiva na escolha do parceiro.

3.2 Estudo comportamental para avaliação da comunicação intra e interespecífica de *Zabrotes subfasciatus* e *Phaseolus vulgaris*.

3.2.1 Estudos eletroantenográficos

No estudo realizado com machos ficou bem evidente que há diferenças significativas nas respostas eletroantenográficas. De acordo com o Teste de Tukey a 1% de probabilidade, o tratamento fêmea viva foi o que proporcionou as maiores ddp's (diferença de potencial), diferindo de todos os outros tratamentos. O extrato de fêmeas e fêmeas + feijão, ambos na concentração de dez equivalente-fêmeas, resultou em ddp's medianas; todos os demais extratos testados provocaram pequenas ddp's, não sendo significativas entre si (Tabela 6; Figura 17).

Provavelmente, as fêmeas vivas exercem maior atratividade sobre os machos que os extratos, pois estes podem ter perdido parte de seus componentes no processo de concentração ou armazenamento. Algumas substâncias bioativas possuem uma baixa estabilidade podendo sofrer reações que levam a degradação; como oxidação, desidratação, rearranjos ou polimerização (SANT'ANA; STEIN, 2001).

Tabela 6 - Resposta eletroantegráficas realizados em antenas de macho de *Z. subfasciatus*

Tratamentos em antena de macho	Médias das respostas (Em mV)
Fêmeas vivas	0,29 a
Extrato de fêmeas + feijão	0,19 ab
Extrato de fêmeas	0,18 ab
Machos vivos	0,09 b
Aeração controle	0,07 b
Branco	0,06 b
Diclorometano	0,06 b
Feijão	0,06 b
Extrato de macho	0,05 b
Extrato de macho+ feijão	0,03 b

Fonte: Autora, 2005.

Nota: Pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade, médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente entre si.

Ao se avaliar as respostas eletroantegráficas de fêmeas, percebeu-se que apenas o extrato de feijão provocou resposta nelas, as demais respostas apesar de existirem foram significativamente pequenas (Tabela 7; Figura 18).

Esses resultados indicam, serem as fêmeas, o sexo liberador do feromônio sexual, visto que elas provocam nos machos, respostas que não são percebidas com nenhum outro tratamento. Além disso, esta suposição já havia sido levantada por Pimbert e Pouzat, (1988), que obtiveram informações semelhantes em testes eletroantegráficos utilizando *Z. subfasciatus* vivos e feijão, afirmando que o feromônio seria sexual e liberado pelas fêmeas. Entretanto, como eles trabalhavam apenas com eletroantegráfia, as diferenças de potencial elétrico, não significa necessariamente uma atração. Essas respostas poderiam advir de inibidores, sem quaisquer atividades relacionadas com o feromônio. Todavia apenas ao se integrar essa técnica, com bioensaios etológicos apropriados, pode-se confirmar com clareza os resultados de atratividade, bem como a elucidação do sexo liberador e o tipo de feromônio em questão.

Tabela 7- Resposta eletroantegráficas realizados em antenas de fêmeas de *Z. subfasciatus*.

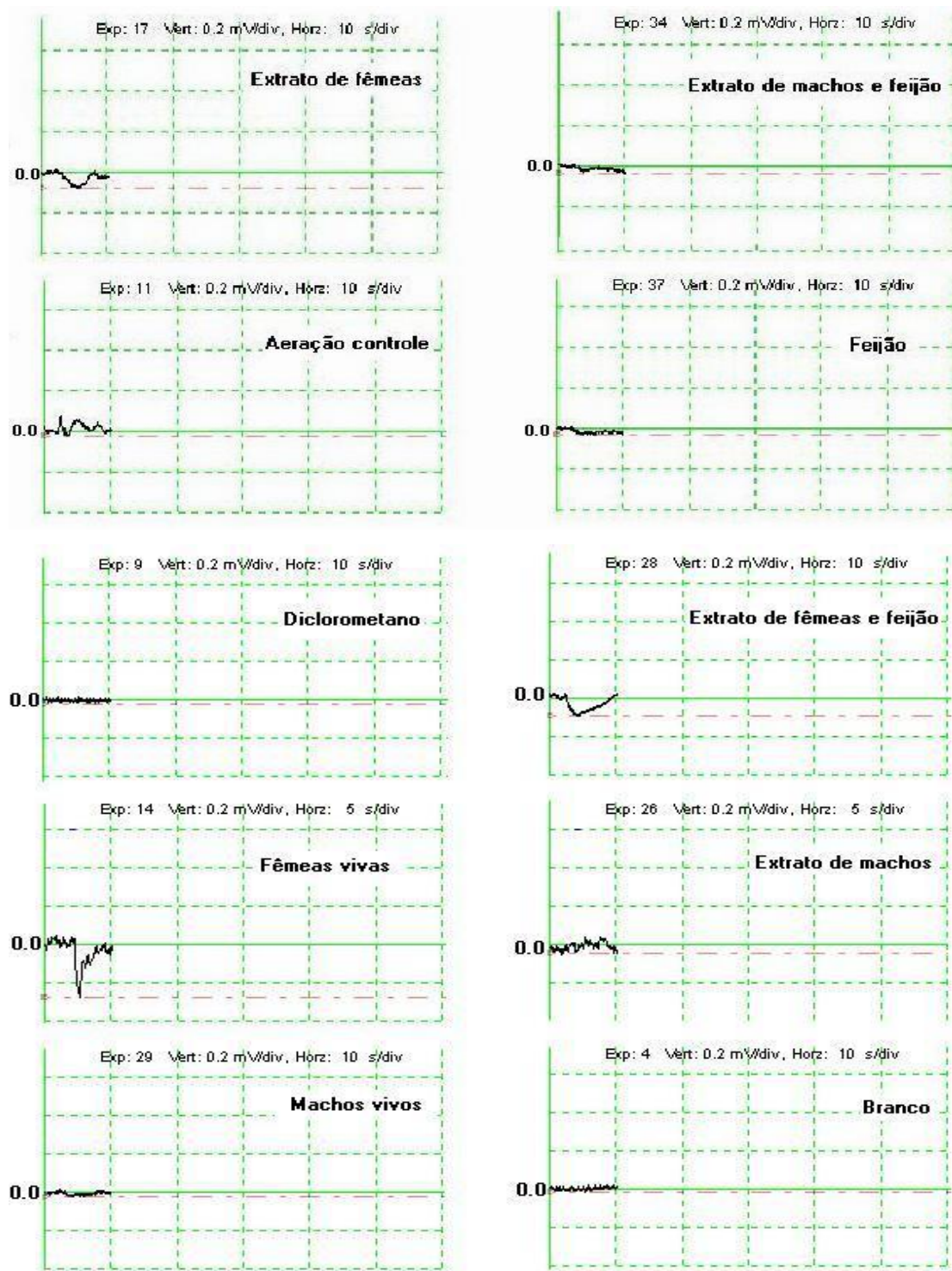
Tratamentos em antena de fêmea	Médias das respostas (Em mV)
Feijão	0,15 a
Diclorometano	0,14 ab
Extrato macho+feijão	0,11 ab
Aeração controle	0,11 ab
Extrato macho	0,09 ab
Branco	0,07 ab
Extrato fêmea +feijão	0,07 ab
Extrato fêmea	0,06 ab
Machos vivos	0,03 ab
Fêmeas vivas	0,02 b

Fonte: Autora, 2005.

Nota: Pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade, médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente entre si.

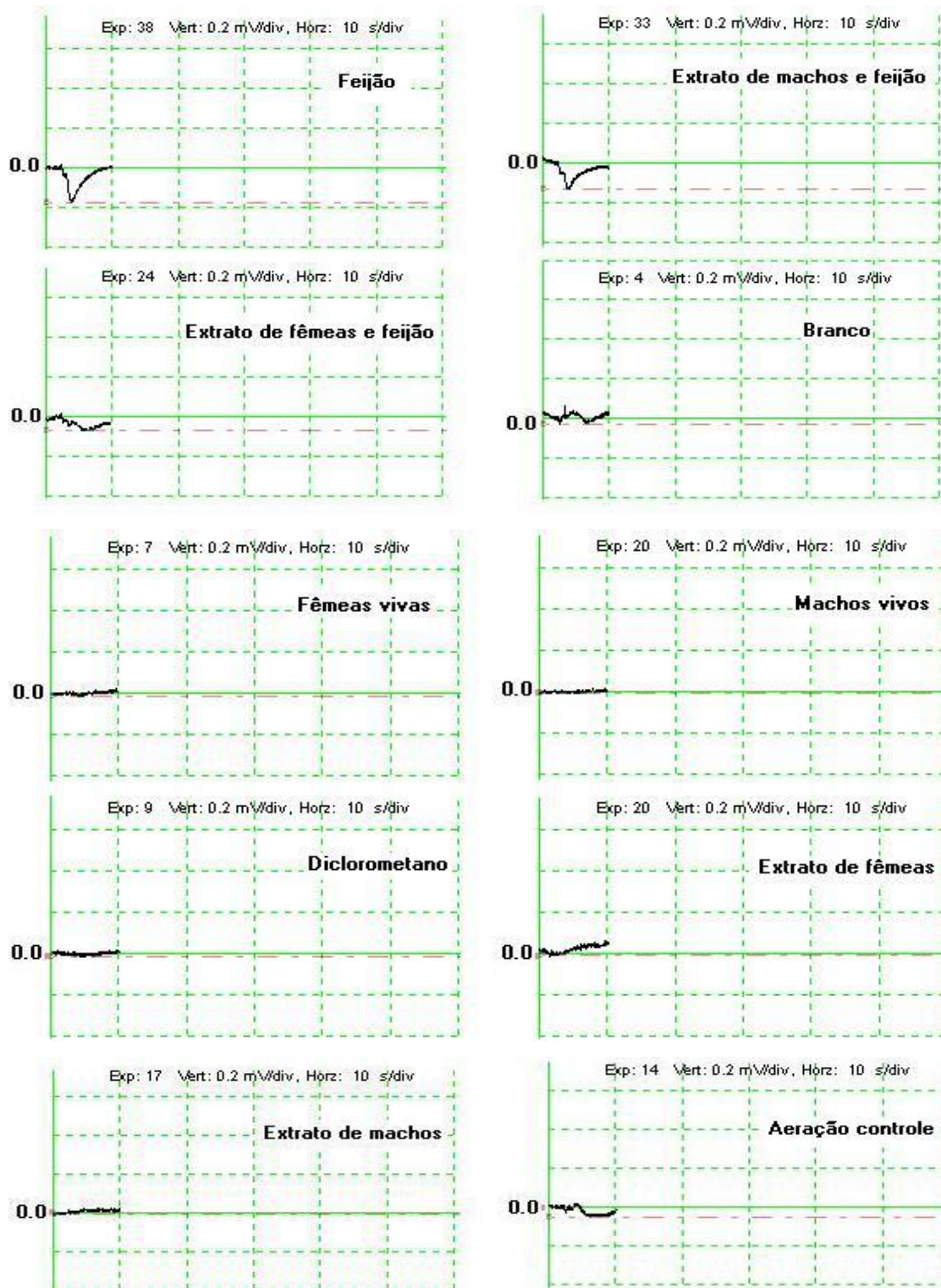
Resultado semelhantes foi obtido por Shu et al. (1995), que ao efetuar estudo eletroantegráficos com *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) observou que as fêmeas ou extratos de fêmeas exerciam respostas sobre os machos, sugerindo que as fêmeas eram o sexo liberador de feromônio, já que as fêmeas praticamente não respondiam aos extratos de machos ou de fêmeas.

Figura 17- Registros eletroantenográficos feitos em antenas de machos



Fonte: Autora, 2005.

Figura 18 - Registros eletroantenográficos feitos em antenas de fêmeas.

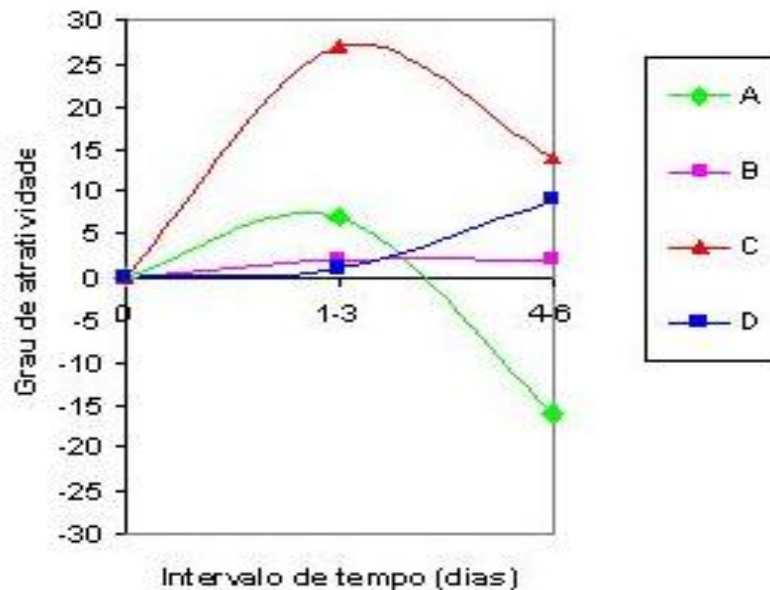


Fonte: Autora, 2005

3.2.2 Bioensaios em olfâmetro

Em testes feito para avaliação da atratividade observou-se dois grupos de insetos um com idade variando de 1 a 3 dias e o outro de 4 a 6 dias. De acordo com a ANOVA teste F, no primeiro grupo apenas fêmeas foram atrativas aos machos, diferindo estatisticamente do controle, enquanto os outros tratamentos não se diferenciaram do controle (Figura 19 , 21 e 22) .

Figura 19 - Influência da idade dos insetos nos graus de atratividades para ambos os sexos, onde A corresponde a machos testando machos, B fêmeas testando fêmeas, C fêmeas testando machos e D machos testando fêmeas.

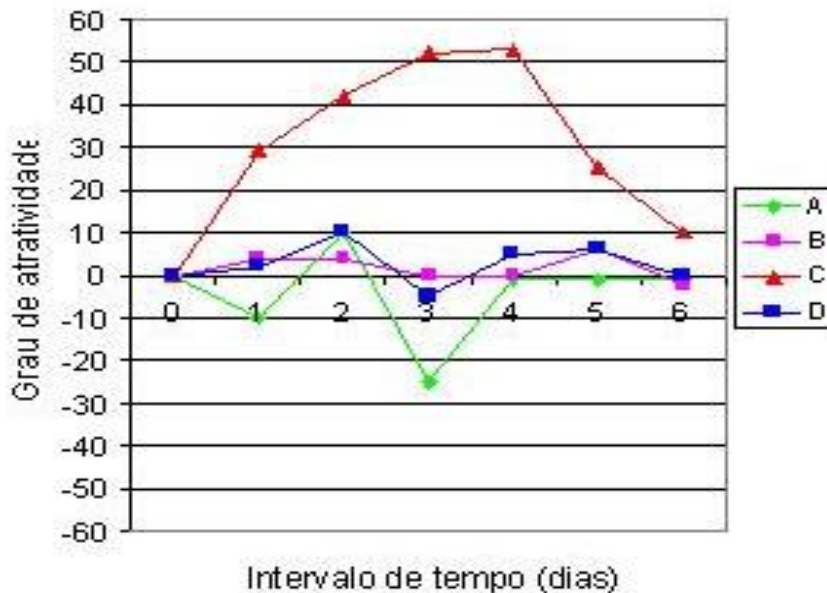


Fonte: Autora, 2005.

Os resultados obtidos acima indicaram que há uma influência da idade dos insetos na sua atratividade para confirmar esta observação novos experimentos foram realizados .Fêmeas de 1, 2, 3, 4 e 5 dias de idade foram muito mais atrativas que os seus respectivos controles, sendo estatisticamente diferentes dos mesmos. Além disso, à medida que a idade foi aumentando até o 4º dia, a diferença entre os valores dos F

calculado e o F tabelado foi aumentando. As fêmeas de 6 dias não foram diferentes do seu controle. Os resultados são claros em definir que as fêmeas de 5 e 6 dias foram pouco atrativas, quando comparadas às demais (Figura 20; Tabelas 4).

Figura 20 - Relação entre atratividade e idade dos insetos, onde A corresponde a machos testando machos, B fêmeas testando fêmeas, C fêmeas testando machos e D machos testando fêmeas.

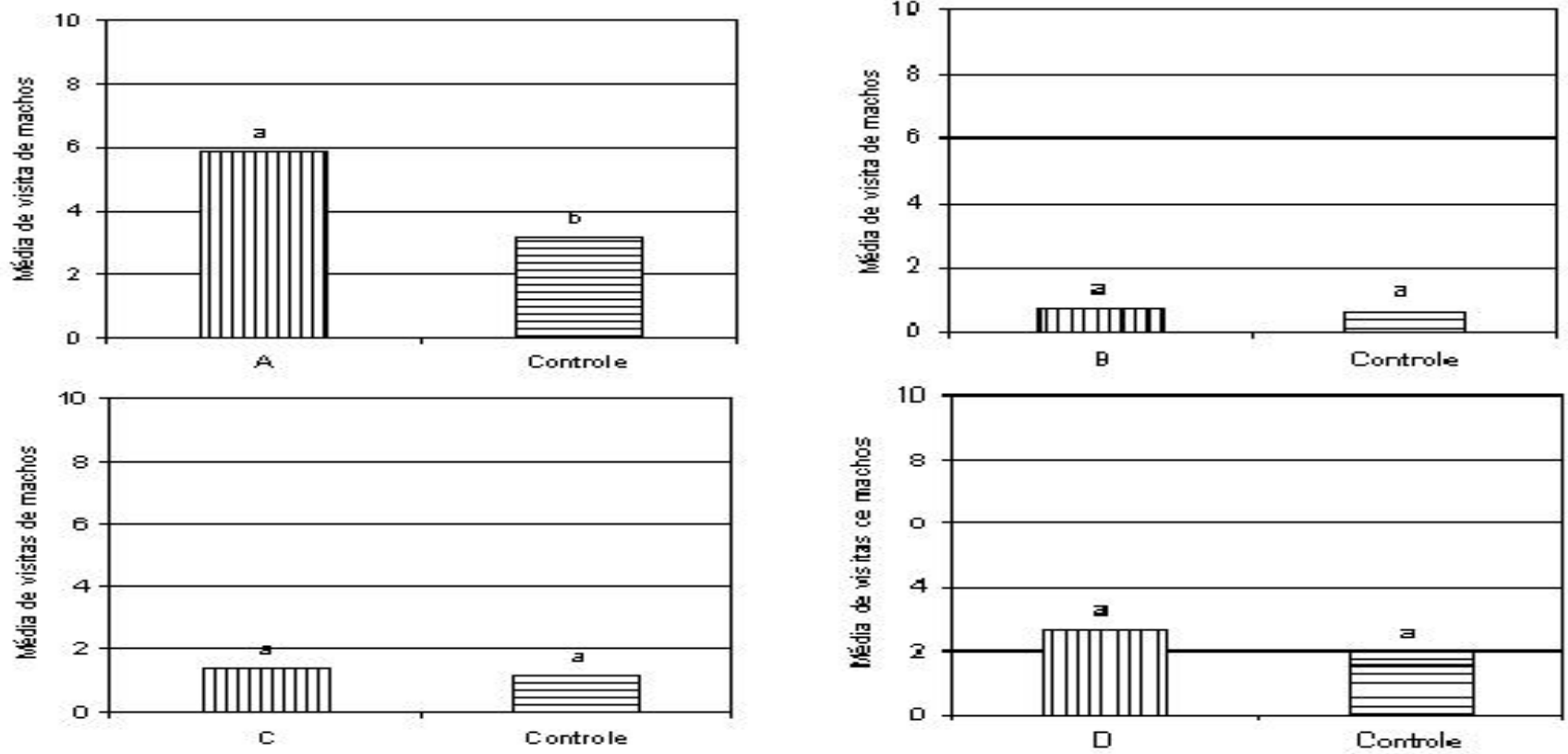


Fonte: Autora, 2005.

Em nenhuma comparação foi observado algum tipo de atratividade dos machos tanto para fêmeas como para macho, descartando a hipótese de produção de feromônio de agregação. Além do mais as fêmeas são atrativas apenas aos machos (Figura 21, 22).

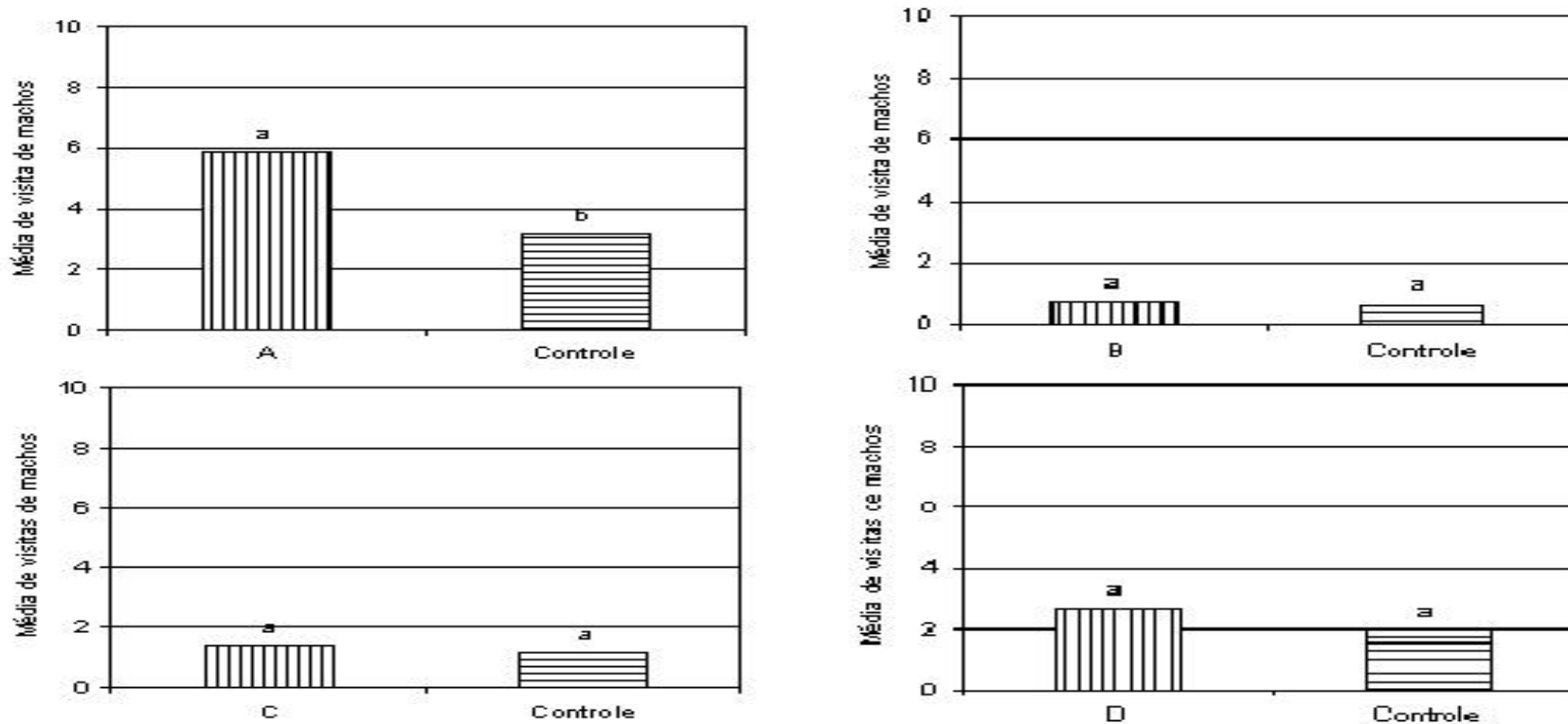
A atração por feromônio sexual para Bruchidea foi observada por Pushpinder (1985), ao estudar o comportamento de acasalamento do *C. maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) nos quais as fêmeas liberam o feromônio. Essa liberação é mais intensa nos primeiros dias de vida e decresce a partir do quinto dia.

Figura 21 - Atratividade, onde: A) Fêmeas de 1 a 3 dias testando machos; B) Macho de 1 a 3 dias testando fêmeas; C) Fêmeas de 1 a 3 dias testando fêmeas; e D) Machos de 1 a 3 dias testando machos. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si.



Fonte: Autora, 2005.

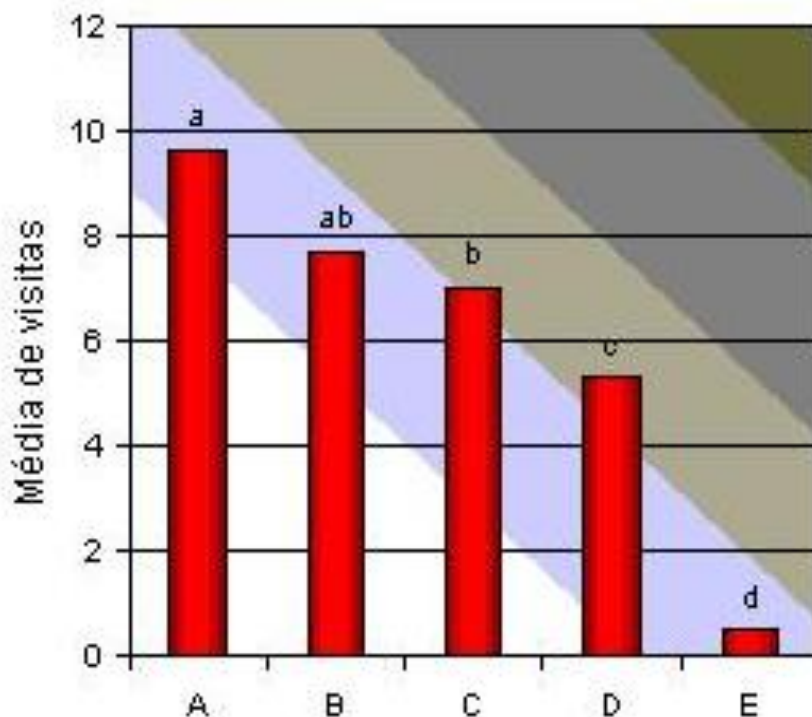
Figura 22- Atratividade, onde: E) Fêmeas de 4 a 6 dias atraindo machos; F) Macho de 4 a 6 dias atraindo fêmeas; G) Fêmeas de 4 a 6 dias atraindo fêmeas; e H) Machos de 4 a 6 dias atraindo macho. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si.



Fonte: Autora, 2005

De acordo com os resultados de olfatométrica, as fêmeas de 4 dias de emergidas foram as mais atrativas, as fêmeas de 3 dias tiveram um comportamento intermediário na atratividade. As fêmeas de 3 dias associadas ao feijão foram mais atrativas do que apenas feijão, não obstante, tiveram uma atratividade significativamente inferior a das fêmeas de 4 dias; o feijão, apesar de diferir do controle, foi pouco atrativo quando comparados aos demais tratamentos (Figura 23).

Figura 23 – Influência da idade e da presença de planta hospedeira na atratividade para machos. Onde: A) Fêmeas de 4 dias de emergidas; B) Fêmeas de 3 dias de emergidas; C) Fêmeas de 3 dias + Feijão; D) Feijão; e E) Controle branco. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Fonte: Autora, 2005.

Os resultados obtidos não deixam dúvida de que a idade das fêmeas influencia na atratividade das mesmas para os machos. Fêmeas de 1 a 5 dias são atrativas, sendo que o aumento da atratividade é progressivo, como o seu pico ocorrendo no

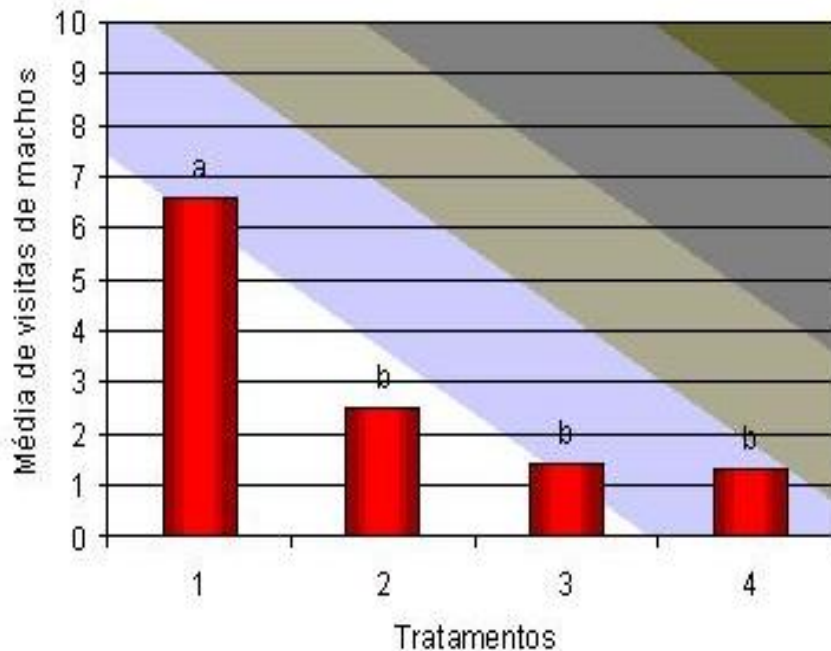
quarto dia de idade, a partir desta idade ele começa a diminuir, e após o quinto dia observa uma brusca redução da atratividade. Fêmeas com seis dias de idades já não são atrativas aos machos. Estes resultados estão completamente em oposição aos defendidos por Pimbert e Pouzat (1988), que afirmaram, apesar de pouco subsídio, que a atratividade das fêmeas começa no sexto dia de emergidas, e que insetos com idade inferior a 5 dias não elucidaram respostas eletroantenográficas em antenas de machos.

A presença do feijão não teve papel desencadeador da produção e liberação de feromônio, como havia sido proposto por Pimbert e Pouzat (1988) , que sugeriram que fêmeas com idades de 1 a 5 dias de emergidas não geravam nenhum registro de EAG em antenas de macho, mas ao entrar em contato por algumas horas com grãos de feijão, passavam a produzir claros registro de EAG em antenas dos machos.

De acordo com os resultados o feijão foi atrativo apenas quando associado às fêmeas, entretanto na sua ausência pouca atratividade exerce aos machos, reforçando ainda mais, que sejam as fêmeas o sexo liberador de feromônio. Assim sendo, descarta-se a possibilidade de que seja um feromônio de agregação, primeiro por que os odores da fêmea são atrativo a apenas um dos sexos (macho); e segundo, a presença da planta hospedeira não regula a sua liberação, visto que os machos preferem às fêmeas ao odores do feijão.

O extrato de fêmeas de *Z. subfasciatus* em diclorometano diferiu estatisticamente do extrato hexânico, entretanto este se mostrou semelhante aos controles (Figura 24), evidenciando a ausência ou pequena quantidade de feromônio no extrato em hexano. A diferença de polaridade entre o solventes influenciou na extração do feromônio. O diclorometano mais polar que o hexano conseguiu extrair os compostos majoritários do feromônio, por isso este demonstrou maior atratividade. Provavelmente o feromônio deve ser constituído de componentes químicos polares.

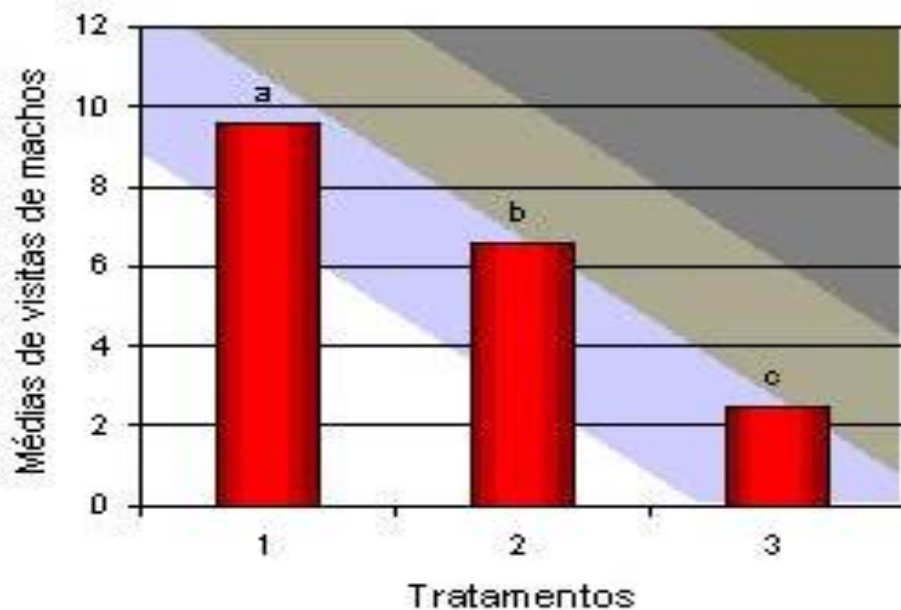
Figura 24 – Atratividade de extratos de fêmeas de *Z. subfasciatus* obtidos com diferentes solventes frente a machos coespecíficos. Onde: 1- Diclorometano (CH_2Cl_2); 2 - Controle (apenas CH_2Cl_2); 3 - Hexano (C_6H_{14}); 4 - Controle (apenas C_6H_{14}). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Fonte: Autora, 2005.

De acordo com a análise de variância e teste de média (Tukey a 5% de probabilidade estatística) a média de visita de machos à câmara contendo fêmeas vivas foi estatisticamente diferente ao número de visitas obtidos com o extratos de fêmeas em CH_2Cl_2 , que por sua vez diferiu do controle (apenas CH_2Cl_2) (Figura 25).

Figura 25 - Atratividade de machos por diferentes tratamentos onde
1- Fêmeas vivas; 2 – Extrato em diclorometano e
3 – Controle (apenas solvente). Médias seguidas de mesma
letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey
a 5% de probabilidade.



Fonte: Autora, 2005.

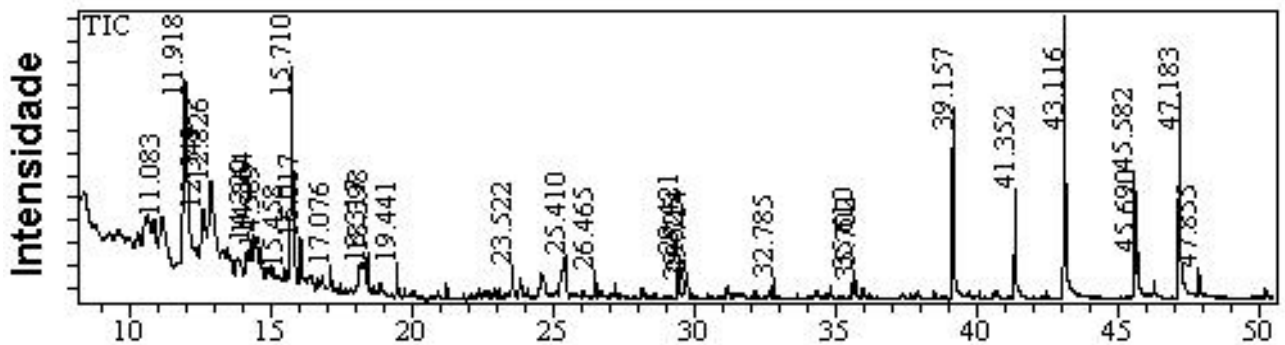
Provavelmente, durante o processo de extração e concentração do extrato de fêmeas, algum componente da mistura feromonal tenha se perdido, visto que as fêmeas vivas são muito mais atrativas do que o seu extrato. Tal fato como já foi mencionado anteriormente, pode ser devido a fatores ligados a alta volatilidade; baixa estabilidade o pode ocasionar reações que levam a sua degradação, como oxidação, desidratação, rearranjos ou polimerização (SANT'ANA; STEIN, 2001)

3.3 Isolamento e identificação de constituintes químicos presentes em extratos de *Zabrotes subfasciatus* resultantes de aeração

Na tabela 8 e na Figura 26 podemos observar que houve diferenças qualitativas e quantitativas na composição química dos extratos obtidos por aeração de machos e fêmeas de *Z. subfasciatus*. O extrato das fêmeas apresentou uma maior variedade de compostos que extrato dos machos, além do que é possível observar que alguns

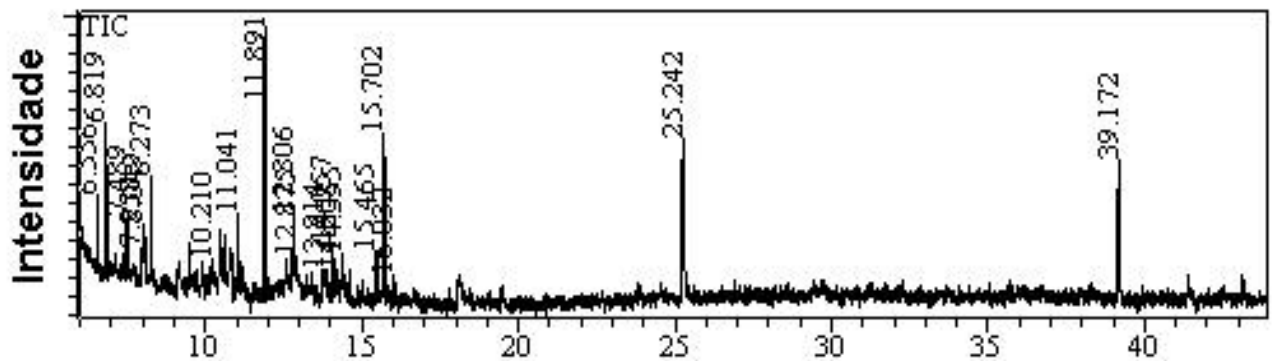
constituintes apesar de iguais apresentam diferenças quantitativas aparecendo em maior quantidade no extrato fêmeas .

Figura 26 - Cromatograma do extrato de fêmeas de *Z. subfasciatus* obtidos através de aeração.




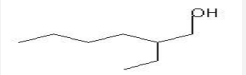


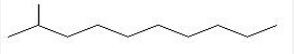
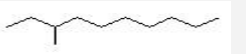
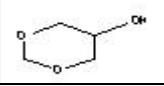

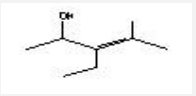
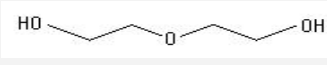
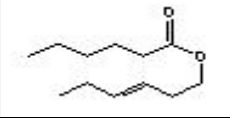
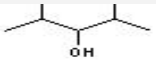


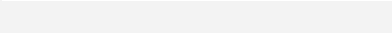
Fonte: Autora, 2005.

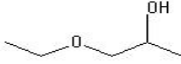
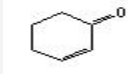
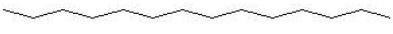
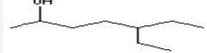
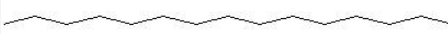
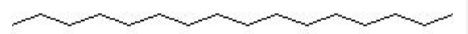


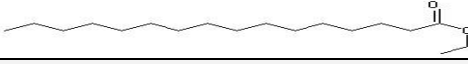

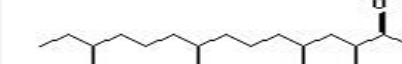
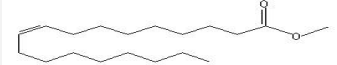
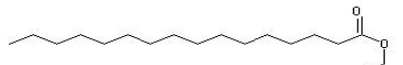
Figura 27 - Cromatograma do extrato de machos de *Z. subfasciatus* obtidos através de aeração.



Fonte: Autora, 2005.

Tabela 8 - Constituintes químicos dos extratos obtidos por aeração de machos e fêmeas de *Z. subfasciatus*. (continua)

<i>Tempo de Retenção</i>	<i>Constituintes</i>	% Fêmea	% Macho
11,918	Decano 	14.79	13.45
12,549	2-Etil-1-hexanol 	3.70	NO
12,826	Isooctilvinil éter 	4.83	3,04
14,220	5-Metil-1-heptanol 	3.00	NO
14,364	2-Metildecano 	3.63	NO
14,589	3-Metildecano 	1.50	NO
15,48	1,3-Dioxan-5-ol 	0.48	NO
15,710	Undecano 	10.63	9.91
16,017	3-Etil-4-metil-3-penten-2-ol 	1.99	NO
17,076	Dietilenoglicol 	0.77	NO
18,317	Hexanoato de E-3-hexenila 	2.98	NO
18,398	2,4-Dimetil-3-pentanol 	1.18	NO
19,441	Dodecano 	1.02	NO
23,522	Tridecano 	Traços	NO
	1-Etoxi-2-propanol 	0.99	NO

				
25,410	2-Ciclohexenona		4.04	12.04
26,465	Tetradecano		0,74	NO
29,421	5-Etil-2-heptanol		2.10	NO
29,714	Pentadecano		0.87	NO
35,785	Hexadecano		0.59	NO
35,720	Heptadecano		0.53	NO
41,352	Hexadecanoato de metila		3.1	NO
43,116	Hexadecanoato de etila		9.63	NO
45,582	9-E-Octadecenoato de metila		4.22	NO
45,690	3,7,11,15-Tetrametilexadecanoato de metila		1.42	NO
47,183	9-Z-Octadecenoato de metila		7.64	NO
47,855	Octadecanoato de etila		0.80	NO

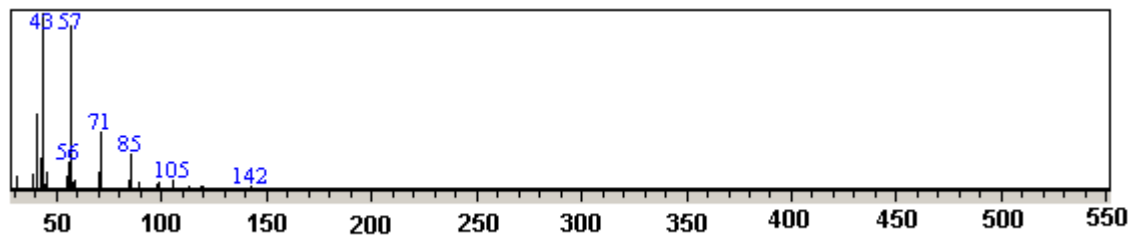
Fonte: Autora, 2005.

Nota: NO= Não observado

Algumas dessas substâncias presentes no extrato da fêmea devem fazer parte da mistura feromonal liberada pelas mesmas, uma vez que os bioensaios demonstram que são as fêmeas as únicas responsáveis, pela liberação do feromônio sexual.

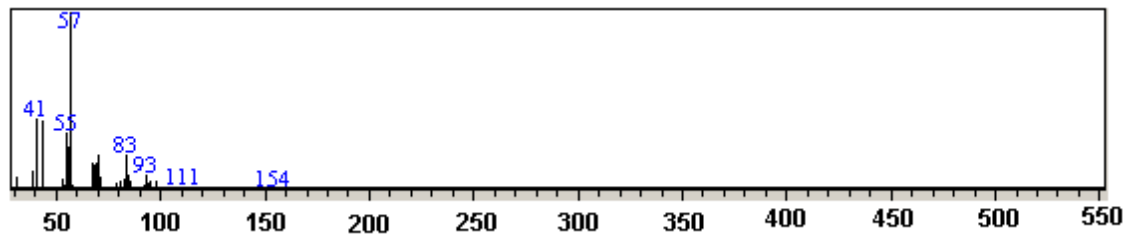
As análises dos extratos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) revelaram que estes extratos eram compostos de uma série homóloga de hidrocarbonetos e compostos oxigenados pertencentes as seguintes classes: álcoois, ácidos carboxílicos, éteres e ésteres. Os ésteres metílicos são derivados de ácidos livres. Os espectros de massas dos compostos dos compostos presentes nos extratos analisados são listados a seguir.

Figura 28 - Espectro de massa do Decano, figura 26, 27 e tabela 8.



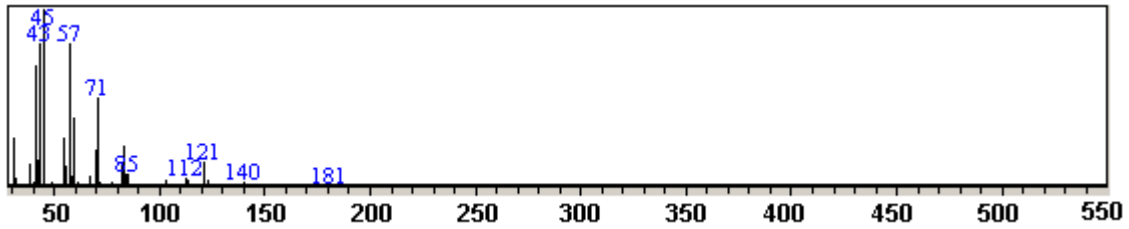
Fonte: Autora, 2005.

Figura 29 - Espectro de massa do 2-Etil-1-hexanol, figura 26 e tabela 8.



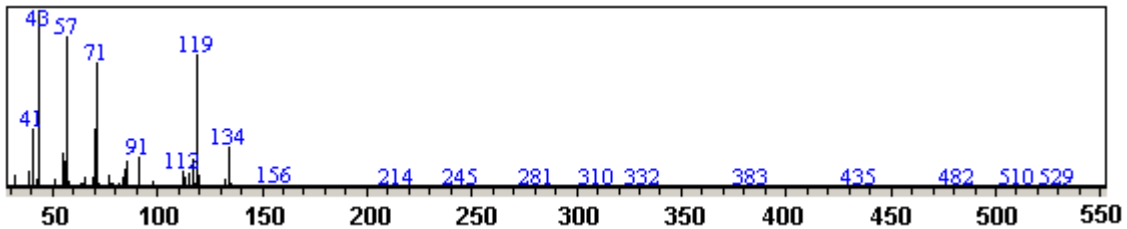
Fonte: Autora, 2005.

Figura 30 - Espectro de massa do Isooctivinil éter, figura 26, 27 e tabela 8



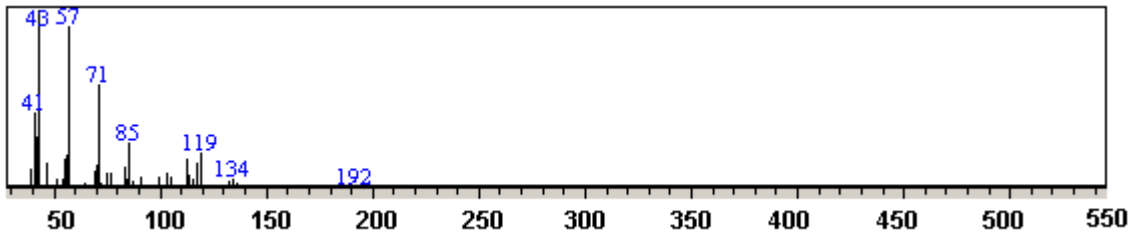
Fonte: Autora, 2005.

Figura 31 - Espectro de massa 5-Metil-1-heptanol, figura 26 e tabela 8.



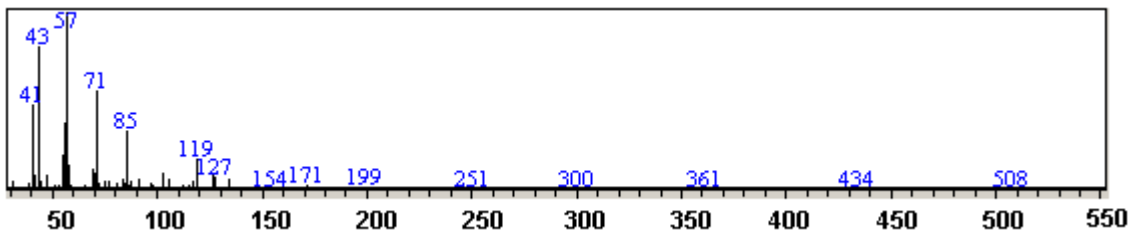
Fonte: Autora, 2005.

Figura 32 - Espectro de massa como 2-Metildecano, figura 26 e tabela 8



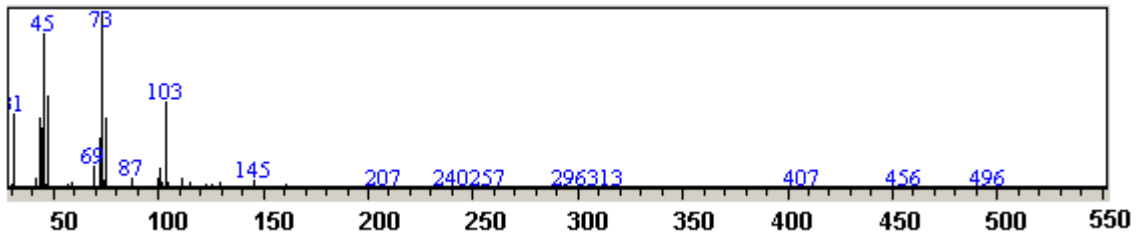
Fonte: Autora, 2005.

Figura 33 - Espectro de massa do 3-Metildecano, figura 26 e tabela 8



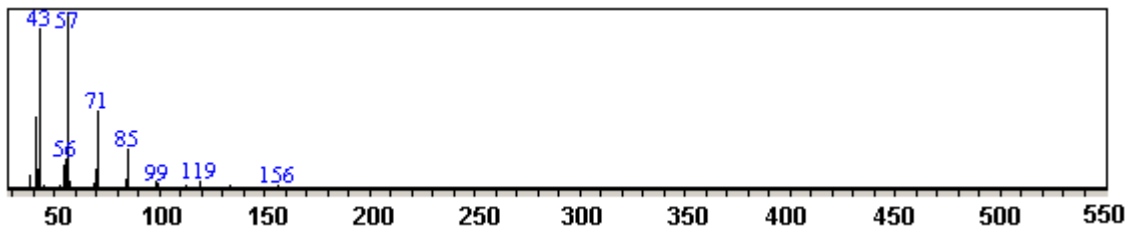
Fonte: Autora, 2005.

Figura 34 - Espectro de massa do 1,3-Dioxan-5-ol, figura 26 e tabela 8



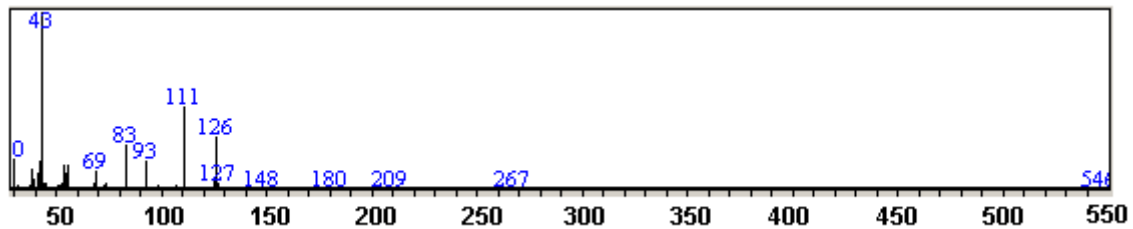
Fonte: Autora, 2005.

Figura 35 - Espectro de massa do Undecano, figura 26, 27 e tabela 8



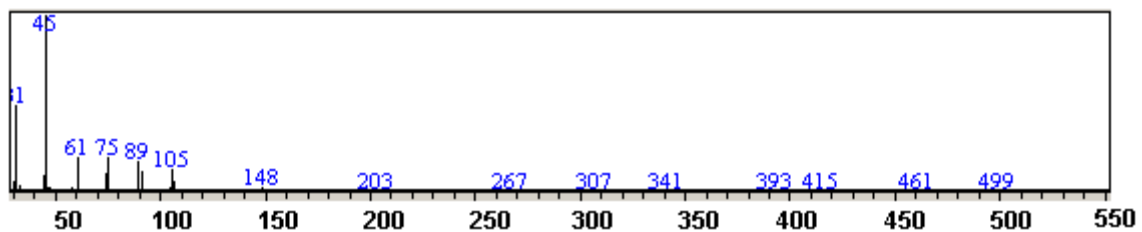
Fonte: Autora, 2005.

Figura 36 - Espectro de massa do 3-Etil-4-metil-3-penten-2-ol, figura 26 e tabela 8.



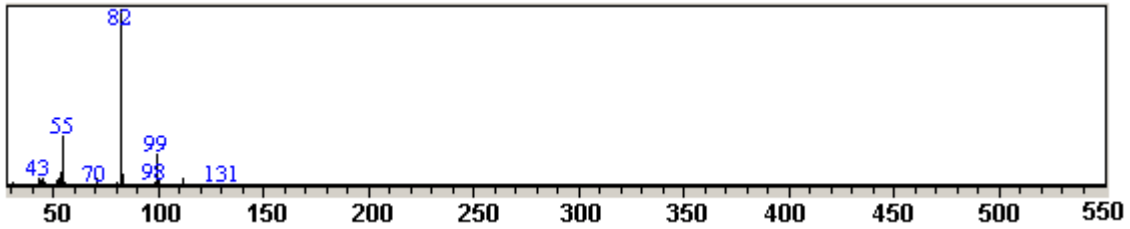
Fonte: Autora, 2005.

Figura 37 - Espectro de massa do Dietilenoglicol, figura 26 e tabela 8



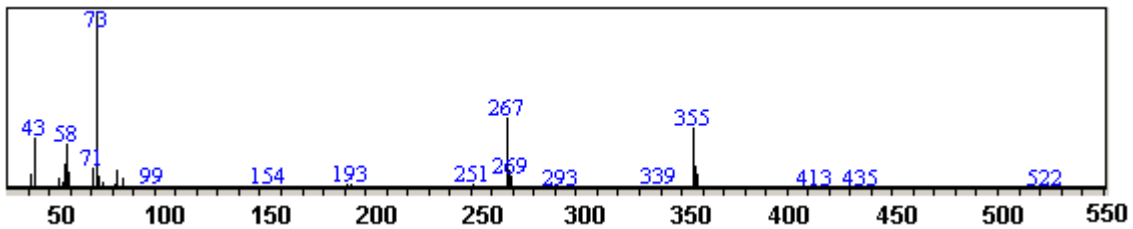
Fonte: Autora, 2005.

Figura 38 - Espectro massa do Hexanoato de *E*-3-hexenila, figura 26 e tabela 8



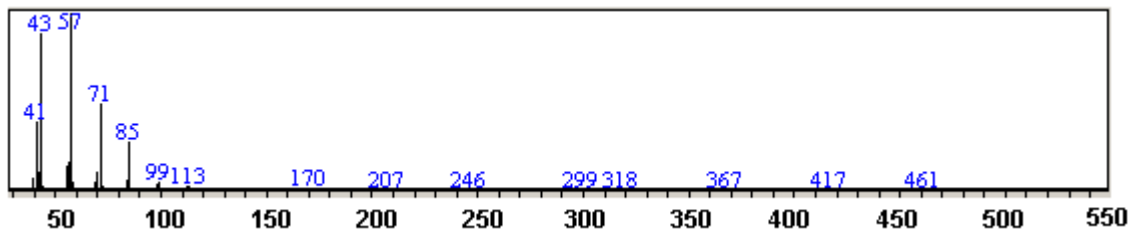
Fonte: Autora, 2005.

Figura 39 - Espectro de massa do 2,4-Dimetil-3-pentanol, figura 26 e tabela 8



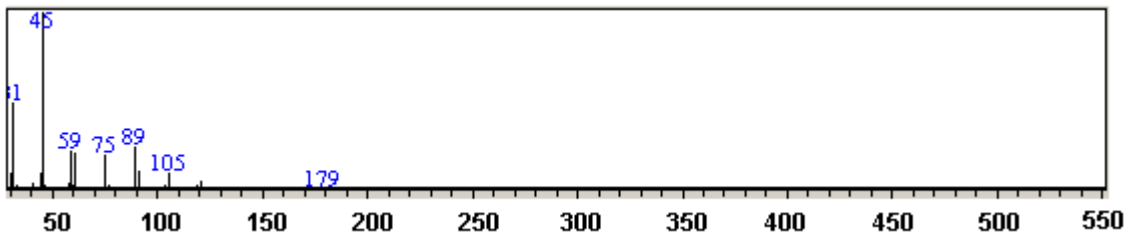
Fonte: Autora, 2005.

Figura 40 - Espectro de massa do Dodecano, figura 26 e tabela 8



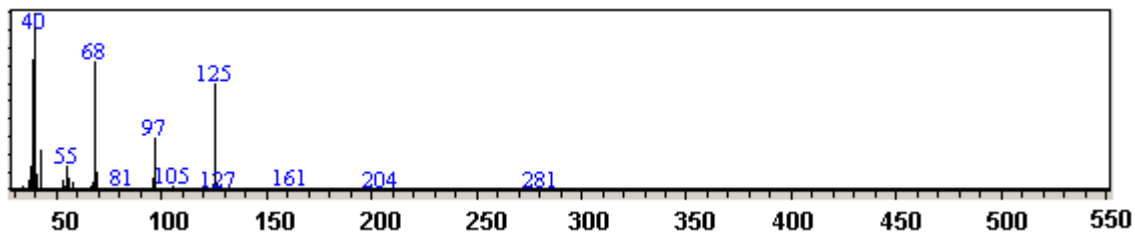
Fonte: Autora, 2005.

Figura 41 - Espectro de massa do 1-Etoxi-2-propanol, figura 26 e tabela 8



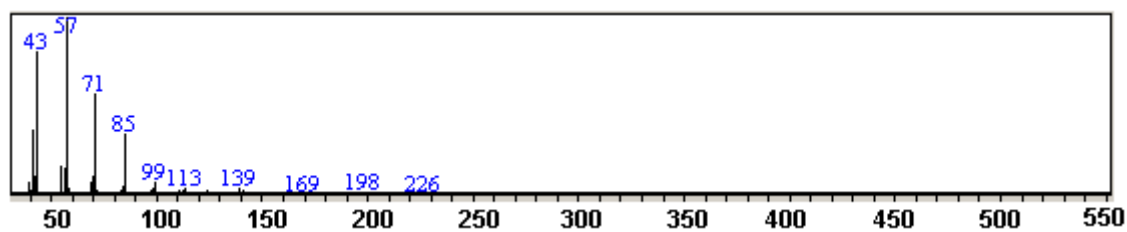
Fonte: Autora, 2005.

Figura 42 - Espectro de massa do 2-Ciclohexenona, figura 26, 27 e tabela 8



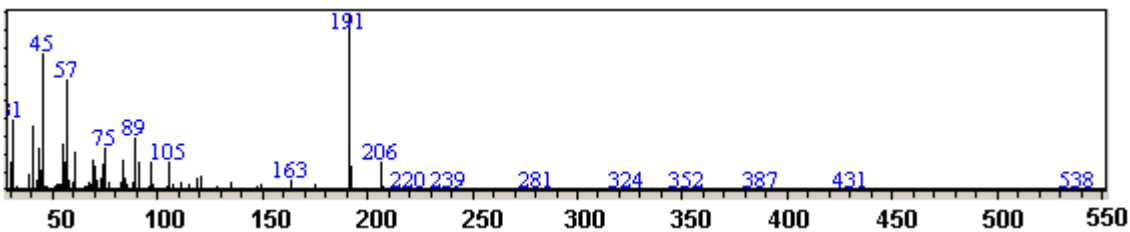
Fonte: Autora, 2005.

Figura 43 - Espectro de massa do Tetradecano, figura 26 e tabela 8



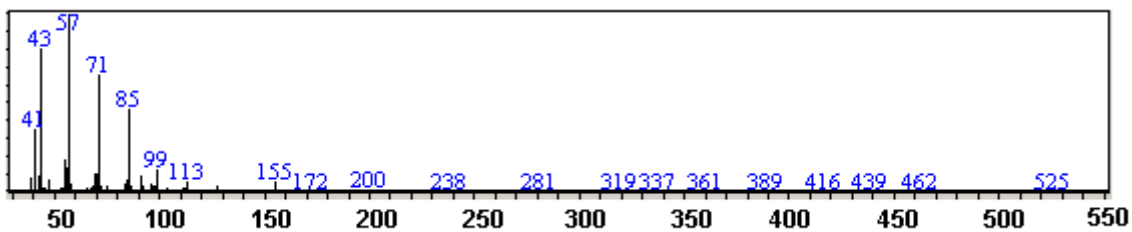
Fonte: Autora, 2005.

Figura 44 - Espectro de massa do 5-Etil-2-heptanol, figura 26 e tabela 8.



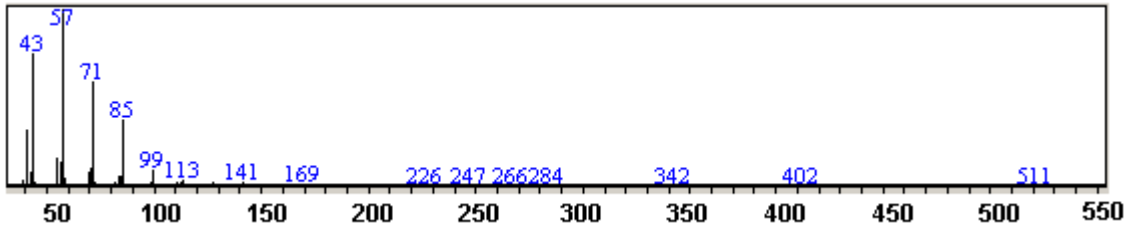
Fonte: Autora, 2005.

Figura 45 - Espectro de massa do Pentadecano, figura 26 e tabela 8.



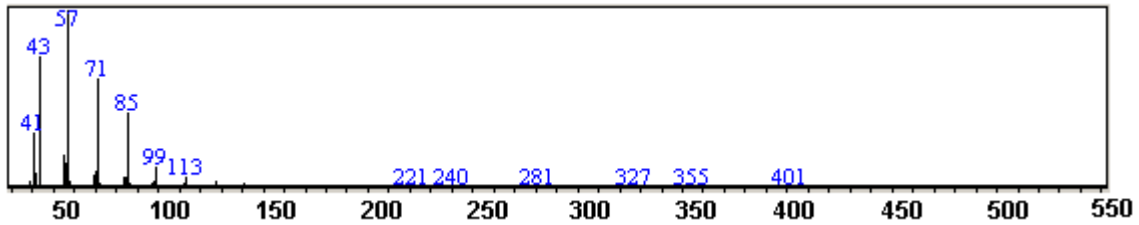
Fonte: Autora, 2005.

Figura 46 - Espectro de massa do Hexadecano, figura 26 e tabela 8



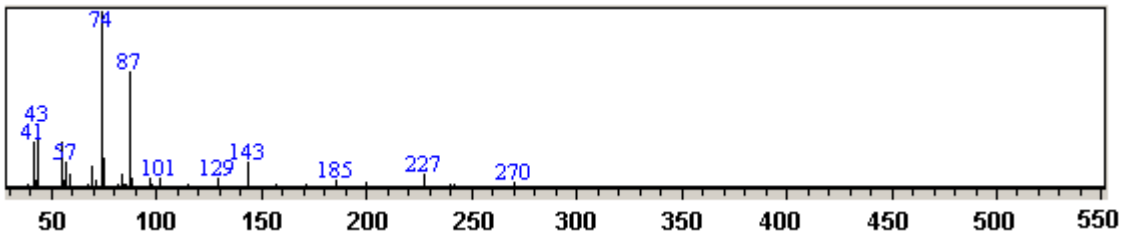
Fonte: Autora, 2005.

Figura 47 - Espectro de massa do Heptadecano, figura 26 e tabela 8.



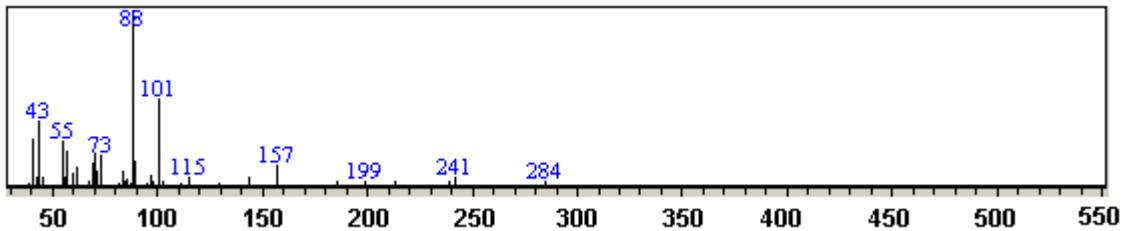
Fonte: Autora, 2005.

Figura 48 - Espectro de massa do Hexadecanoato de metila, figura 26 e tabela 8.



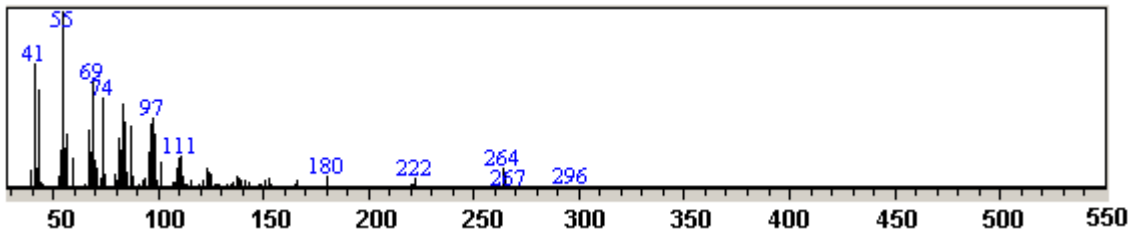
Fonte: Autora, 2005.

Figura 49 - Espectro de massa do Hexadecanoato de etila, figura 26 e tabela 8



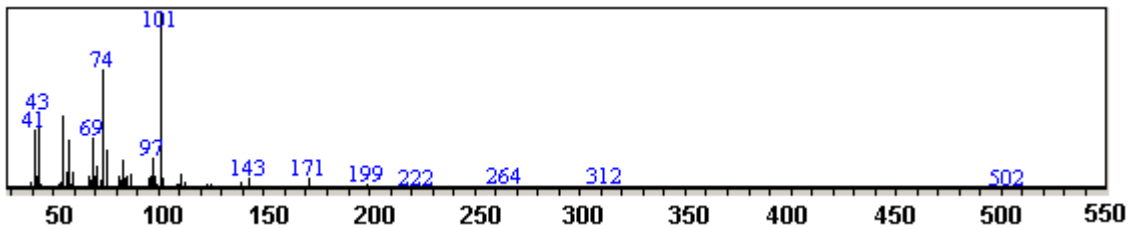
Fonte: Autora, 2005.

Figura 50 - Espectro do 9-*E*-Octadecenoato de metila, figura 26 e tabela 8.



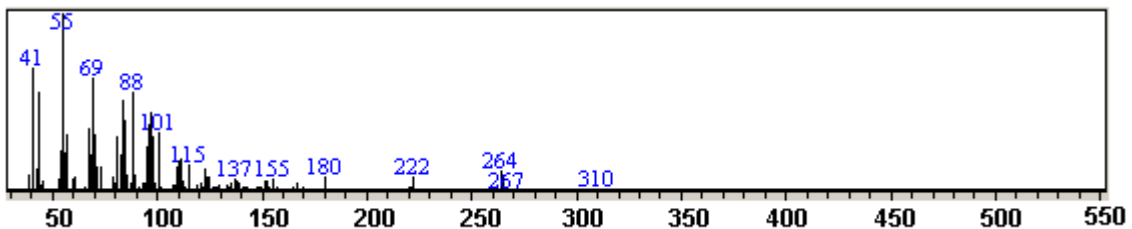
Fonte: Autora, 2005.

Figura 51 - Espectro de massa do 3,7,11,15- Tetrametilexadecanoato de metila, Figura 26 e tabela 8



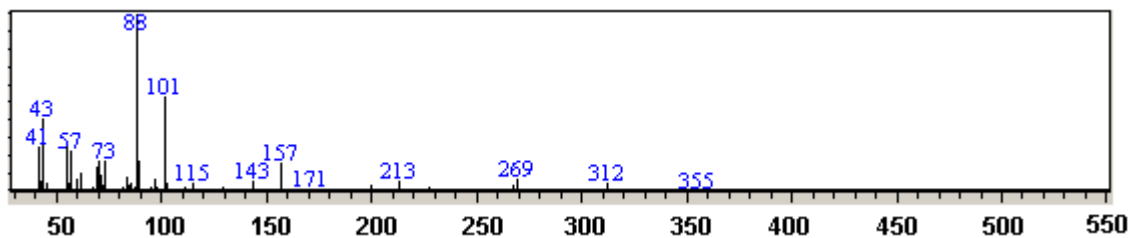
Fonte: Autora, 2005.

Figura 52 - Espectro de massa do 9-*Z*-Octadecenoato de metila, figura 26 e tabela 8.



Fonte: Autora, 2005.

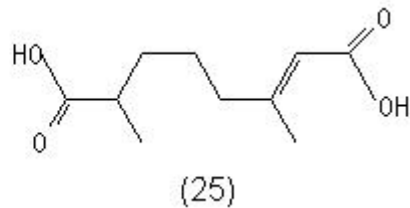
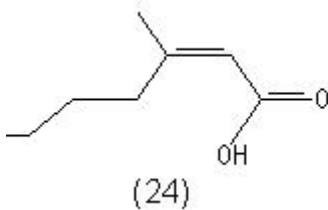
Figura 53 - Espectro de massa do Octadecanoato de etila figura 26 e tabela 8



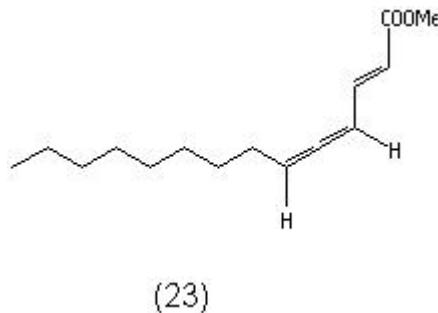
Fonte: Autora, 2005.

A semelhança do *Z. subfasciatus* com a espécie do gênero *Callosobruchus* por serem Bruquideos e terem a fêmea como responsável pela liberação do feromônio, indica uma grande possibilidade do feromônio estar relacionado a um ácido carboxílico. Através de reações de metilação os ácidos livres presentes nos extratos, foi possível demonstrar a presença de ácidos carboxílicos de cadeia saturada e insaturada.

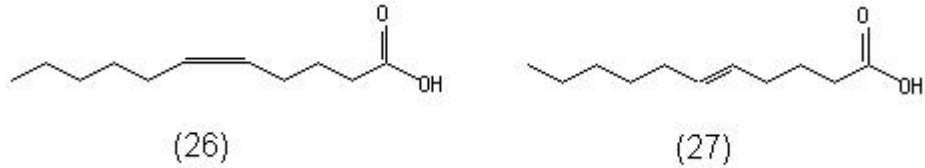
Em indivíduos do gênero *Callosobruchus* (Coleoptera:Bruchidae) foram identificados principalmente ácidos carboxílicos produzidos por fêmeas que induziam resposta comportamental em machos coespecíficos. As espécies *C. analis* e *C. maculatus* tiveram seus feromônios identificados como o ácido (Z)-3-metil-2-heptanoico (24) (PHILLIPS et al., 1996; CORK et al., 1991). Para *C. chinensis* o composto ativo foi o ácido (E)-3,7-dimetil-2-octeno-1,8-dioico (25) (TANAKA et al., 1981).



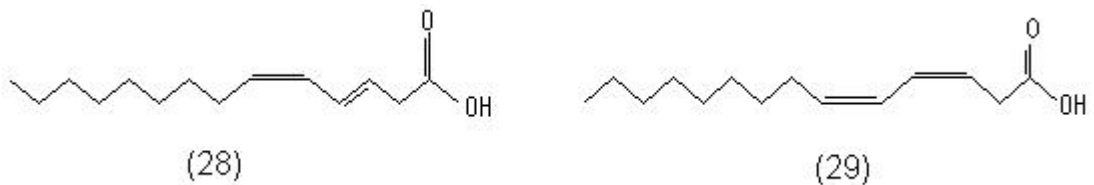
Em *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae) os machos liberam o feromônio. O composto ativo que teve sua estrutura química definida como o éster (E,Z,Z)-2,4,5- tetradecatrienoato de metila (23) (BOUGHTON; FADAMIRO, 1996).



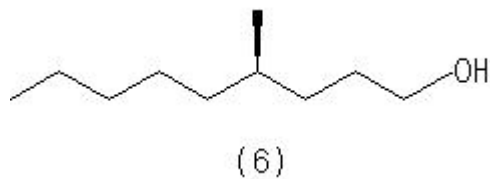
Os coleópteros da família Dermestidae do gênero *Athrenus* apresentam como feromônio uma mistura 85: 15 dos ácidos carboxílicos, isoméricos (Z) e (E) ácido 5-undecenóico (26) e (27).



Ácidos também fazem parte do feromônio de espécies do gênero *Attagenus*. Fêmeas da espécie *Attagenus megatoma* é responsável pela liberação do ácido (3E, 5Z) (28) megatômico enquanto o *A elongatus* produz o isômero (3Z, 5Z) deste mesmo ácido (29) (MOREIRA et al., 2005).



Para fêmeas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) o feromônio sexual é o álcool (R)-4-metil-1-nonanol (6) (MOREIRA et al., 2005).



Vários álcoois de cadeia ramificada foram encontrados em extratos de Fêmeas de *Z subfasciatus*.

Os hidrocarbonetos que aparecem em uma série homóloga, podem tanto fazer parte da mistura feromonal ou ainda serem apenas resultantes de contaminação da cutícula do inseto.

Provavelmente um ou mais desses compostos podem ser o feromônio sexual, liberado pelas fêmeas da espécie de bruquideo *Z. subfasciatus*. Estas demonstraram liberar um número maior de constituintes químicos em seus extratos do que os machos. Estes extratos foram testados em eletroantenografia e olfatometria, comprovando a sua atividade apenas sobre os machos o que caracteriza o feromônio como sendo sexual e não de agregação.

4 CONCLUSÃO

A seqüência do comportamento de corte e cópula no *Z. subfasciatus* não foi muito elaborada. Machos conseguiram copular até quatro vezes seguidas com fêmeas diferentes, enquanto a fêmea só aceitou copular uma vez durante o período observado. O tempo médio de cópula foi de 20,1 minutos.

Machos e fêmeas de *Z. subfasciatus* apresentaram diferenças morfológicas quanto às cerdas da região dorsal. Cerdas de fêmeas são ramificadas e volumosas enquanto as dos machos são filiformes.

Quando a razão foi de 1:1 entre machos e fêmeas, aumentou o número de acasalamentos enquanto que diferença diminuiu esse número .

Nos testes eletroantegráficos apenas machos responderam de maneira positiva aos tratamentos; fêmeas vivas e extrato de fêmeas, fêmeas+feijão utilizando como solvente diclorometano.

Os testes realizados com olfatômetro, confirmaram ser as fêmeas de *Z. subfasciatus* as responsáveis pela liberação do feromônio o qual exerce atratividade apenas nos machos. O feromônio foi classificado como sexual.

O grau de atratividade aumenta até o 4º dia, ocorrendo uma diminuição a partir do 5º dia. As fêmeas de idade superior a seis dias foram completamente sem atratividade aos machos. Os machos não exercem nenhuma atratividade para ambos os sexos.

A planta hospedeira (grão de feijão) não exerce grande influência na atratividade dos insetos.

O extrato de fêmeas obtido com diclorometano foi mais atrativo que o extrato em hexano.

Fêmeas apresentam maior quantidade e variedade de compostos químicos em seus extratos, que os machos.

No extrato de fêmeas foram encontrados uma série homologa de hidrocarbonetos e compostos oxigenados como; álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres e éter.

REFERÊNCIAS

- ASHWORT, J. R. The biology of *Lasioderma serricorne*. **J. Stored Prod. Res.**, New York, v. 29, p. 291-303, 1993. ISSN 0022-474X.
- ATKINS, M. D. **Introduction to insect behavior**. New York: MacMilan Publishing, 1980.
- AUGUST, C. J. The role of male and female pheromones in the mating behaviour of *Tenebrio molitor*. **J. Insect Physiol.**, Oxford, v. 17, p. 739-751, 1971. ISSN 0022-1910.
- BAKKE, A.; LIE, R. Mass trapping. In: JUSTTSUM, A. R.; GORDON, R. F. S. **Insect pheromone in plant protection**. London: John Wiley & Sons, 1989. p. 67-8.
- BARBOSA, F. R. Controle do caruncho do feijoeiro *Zabrotes subfasciatus* com óleos vegetais, munha, matérias inertes e malathion. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, DF, v. 7, n.9, p. 1213-1217, 2002. ISSN 0100-204X.
- BASHIR, T. Pheromone release by *Rhyzopertha dominica* (F) (Coleoptera: Bostrichidae) in the laboratory: daily rhythm, inter-male variation and association with body weight and/or boring activity. **J. Stored Prod. Res.**, New York, v. 39, p. 159-169, 2001. ISSN 0022-474X.
- BOUGHTON, A.; FADAMIRO, H. Y. J. Effect of age and sex on the response of walking *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) to its male produced aggregation pheromone. **J. Stored Prod. Res.**, New York, v. 32, p. 13. 1996. ISSN 0022-474X.
- BRIGIDE, P. **Disponibilidade de ferro em grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) irradiados**. 2002. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.
- BROWN, W. L. J.; EISNER, T.; WHITTAKER, R. H. Allomones and Kairomones: transpacific chemical messengers. **Bioscience**, Washington, v. 20, p. 21-22, 1970. ISSN 0006-3568.
- BUCHELOS, C. T.; LEVINSON, A. R. Efficacy of multisurface traps and lasiotraps with and without pheromone addition, for monitoring and mass-trapping of *Lasioderma serricorne* in insecticide-free tobacco stores. **J. Appl. Entomol.**, Berlin, v. 116, p. 440-448, 1993. ISSN 0931-2048.

BUCKLAND, P. C. The early dispersal of insects pest of stored products as indicated by archaeological records. **J. Stored Prod. Res.**, New York, v. 17, p. 1-12, 1981. ISSN 0022-474X.

BURKHOLDER, W. E. Practical use of pheromone and other attractants for stored-products insects. In: RIDGWAY, R. L.; SILVERSTEIN, R. M.; INSCOE, M. N. (Ed.). **Behavior-modifying chemicals for insect management**. New York: M. Dekker, 1990. p. 497-515.

CAMARGO, J. L. G.; MELO, A. B. P. O uso de feromônio como técnica auxiliar no controle do bicho-do-fumo. **Informe Agropecuário EPAMING**, Belo Horizonte, v. 12, p. 45-47, 1986. ISSN 0100-3364.

CAMPION, D. G. et al. Mating disruption. In: JUTSUM, A. R.; GORDON, R. F. S. **Insect pheromone in plant protection**. London: John Wiley & Sons, 1989.

CARVALHO, R. P. L.; ROSSETO, C. J. Biologia de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v.13, p. 105-117. 1968. ISSN 0085-5626.

CHUMAN, T. et al. 4,6-Dimetil-7-hydroxy-nonan-3-one, a sex pheromone of the cigarette beetle (*Lasioderma serricornis* F.). **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v. 25, p.2361-2364. 1979. ISSN 0040-4039.

CORK, A. et al. Identification of a component of the female sex pheromone of *Callosobruchus analis* (Coleoptera: Bruchidae). **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v. 32, p.129-132. 1991. ISSN 0040-4039.

COX, P. D.; COLLINS, L. E. Factors affecting the behavior of beetles pests in stored grain, with particular reference to the development of lures. **J. Stored Prod. Res.**, New York, v. 38, p. 95-115, 2002. ISSN 0022-474X.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: Botanical Garden. 1988.

DENDY, J.; CREDLAND, P. F. Development fecundity and egg dispersion of *Zabrotes subfasciatus* Boh (Coleoptera: Bruchidae). **Entomol. Exp. App.**, Amsterdam, v. 59, p. 7-9. 1989. ISSN 0013-8703.

DICKE, M.; SABELIS, M. Infochemical terminology: should it be based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? **Funct. Ecol.**, Oxford, v. 2, p.131-139.1988. ISSN 0269-8463.

EIRAS, A. E.; MAFRA NETO, A. Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento de insetos In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. **Feromônio de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2001.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Cultivo do feijoeiro comum**: importância econômica. Santo Antônio de Goiás, 2003. (Sistema de Produção, 2). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/importancia.htm>. Acesso em: set. 2004. ISSN: 1679-8869.

FERREIRA, A. M. **Subsídios para o estudo de uma praga de feijão (*Zabrotes subfasciatus* Boh. – Coleoptera; Bruchidae) dos climas tropicais**. São Paulo: G. de Orta, 1960.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. (Biblioteca de Ciências Agrária Luiz de Queiroz, 10).

_____. et al. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1988.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Insects an outline of entomology**. Camberra: Chapman & Hall, 1994.

HARDEE, D. et al. Procedure for bioassaying the sex attractant of boll weevil. **J. Econ. Entomol.**, v. 62, p. 71-169, 1967. ISSN: 1938-291X.

HORLER, D. F. (-) Metil-*N*-Tetradeca-*Trans*- 2,4,5-Trienoate an allenic ester produced by male dried bean beetle, *Acanthoscelides obtectus* (Say) **J. Chem. Soc.**, London, v. 6, p. 859, 1970. ISSN 0368-1769.

HOWE, R. W.; CURRIE, J. E. Some laboratory observations on the rates of development, mortality and oviposition of several species of bruchidae breeding in stored pulses. **Bull. Entomol. Res.**, v. 55, n. 3, p. 437-477, 1964. ISSN 0007-4853.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução á taxonomia vegetal. São Paulo: Editora Nacional, 1988.

JUTSUM, A. R.; GORDON, R. F. S. **Insect pheromone in plant protectio**. London: John Wiley & Sons, 1989.

KLOPFER, P. H.; HATCH, J. J. Experimental considerations. In: SEBEOK, T. A. (Ed.). **Animal communication**. Bloomington: University of Indiana Press, 1968.

KODAMA, H. et al. Stegobiol, a new sex pheromone component of drugstore beetle (*Stegobium paniceum* L). **J. Chem. Ecol.**, New York, v. 13, p. 1871-1879, 1987. ISSN 0098-0331.

KREBS J. R.; DAVIS N. B. **Introdução à ecologia comportamental**. São Paulo: Atheneu, 1996.

- KUWAHARA, Y. et al. Chemical studies on the Anobiidae: sex pheromone of the drugstore beetle, *Stegobium paniceum* (L.) (Coleoptera). **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v. 34, p.1769-17774, 1978. ISSN 0040-4020.
- LAW, J. H.; REGNIER, F. E. Pheromones. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 40, p. 533-548, 1971. ISSN 0066-4154.
- LEVINSON, H.; LEVINSON, A. Control of stored food pest in the ancient Orient and classical antiquity. **J. Appl. Entomol.**, Berlin, v. 122, p. 137-144. 1998. ISSN 0931-2048.
- LEVINSON, H. et al. The pheromone activity of anhydroserriornin and serriornin for male cigarette beetles (*Lasioderma serricornis* f.). **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 68, p.148-149, 1981. ISSN 1432-1904.
- LETRAIT P. et al. Pheromone release by the two forms of *Callosobruchus maculatus* females; effects of age, temperature, and host plant. **Physiol. Entomol.**, London, v. 20, p. 309-317. 1995. ISSN 1365-3032.
- LEWIS, B.; GOWER, M. **Biology of communication**. London: Blackie, 1980.
- LEWIS, T. The elements and frontiers of insects communication. In; LEWIS, T. **Insect communication**. London: Academic Press. 1984. p. 1-27.
- LINSLEY, E. G. Natural sources, habitats and reservoirs of insects associated with stored foods products. In: CALIFORNIA AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION **Hilgardia**. Riverside, 1944.
- MATTHEWS, R. W. Courtship of *Melittobia wasps*. In: MATTHEWS, J. R.; _____. (Ed.) **Insect behavior**. Bolder: Westview Press, 1982. p. 66-162.
- MEER, R. K. V. et al. (+)-Des-N- morphinan: a unique bridged hydrocarbon attractant for the rhinoceros beetles, *Oryctes rhinoceros*; and development of an olfactometer. **Environ. Entomol.**, Lanham, v. 8, n. 1, p. 6-10. 1979. ISSN 0046-225X.
- MENDONÇA, F. A. C. **Atratividade da planta hospedeira e liberação de feromônio de agregação por *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae), em olfatômetro**. 1995. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.
- _____. et al. Comportamento de corte e cópula do predador *Supputius cincticeps* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae) em laboratório. **An. Soc. Entomol. Bras.**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, 1997. ISSN 0301-8059.

- MILLAR, J.G et al. Aggregation pheromones of the flat grain beetle, *Cryptolestes pusillus* (Coleoptera: Cucujidae). **J. Chem. Ecol.**, New York, v. 11, p.1053-1070, 1985. ISSN 0098-0331.
- MOREIRA, M.A et al. Feromônio associados aos coleópteros- pragas de produtos armazenados. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, p. 472-477, 2005. ISSN 0100-4042.
- NORDLUND, D. A.; LEWIS, W. J. Terminology of chemical-releasing stimuli in intraspecific interactions. **J. Chem. Ecol.**, New York, v. 2, p. 211-220, 1976. ISSN 0100-4042.
- OEHLSCHLAGER, A. C. et al. Chirality of macrolide pheromones of grain beetles in the genera *Oryzaephilus* and *Cryptolestes* and its implications for species specificity. **J. Chem. Ecol.**, New York, v. 13, p. 1543-1554, 1987. ISSN 0100-4042.
- PHILLIPS, T. W. et al. Identification of sex pheromones from cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*, and related studies with *C. analis* (Coleoptera; Bruchidae). **J. Chem. Ecol.**, New York, v. 22p. 2233-2249, 1996. ISSN 0100-4042.
- PIERCE, A.M. et al. Influence of pheromone chirality on response by *Oryzaephilus surinamensis* and *Oryzaephilus mercator* (Coleoptera: Cucujidae). **J. Chem. Ecol.**, v. 13, p. 1525-1542, 1987. ISSN 0100-4042.
- PIERCE, L. H. Supresión of cigarette beetles, *Lasioderma serricornis* by focussed mass trapping. In: INTERNATIONAL WORKING CONFERENCE ON STORED-PRODUCT PROTECTON, 7th, 1999. Beijing. **Proceedings...** Beijing: ZUXUN, J. et al. 1999. v. 2, p. 1455-1463.
- PIMENTEL, D. World resources and food losses to pest. In: GORHAM, J. R. (Ed.). **Ecology and management of food-industry pest**. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists, Food and Drug Administration, 1991. p. 5-11. (Technical Bulletin 4).
- PIMBERT, M.; POUZAT, J. Electroantennogram response of *Zabrotes subfasciatus* to odours of sexual partner. **Entomol. Exp. Appl.**, Amsterdam, v. 47, p. 49-53, 1988. ISSN 0013-8703.
- PUSHPINDER, J. R. Mating and its attendant behavior of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **J. Stored Prod. Res.**, New York, v. 22, p. 77-79, 1985. ISSN 0022-474X.
- QUI, Y.; BURKHOLDER, W. E. Sex pheromone biology and behavior of cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **J. Chem. Ecol.**, New York, v. 8, p. 527-534, 1982. ISSN 0100-4042.
- QUINTELA, E. D. **Manual de identificação dos insetos e invertebrados**: pragas do feijoeiro. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002.

ROSSETTO, C. J. Sugestões para armazenamento de grãos no Brasil. **O Agrônomo**, Campinas, v. 18, n. 9/10, p. 38-51, 1996. ISSN 0365-2726.

RICHARD, G. Sequential analysis and regulation of insect reproductive behaviour. In: BARTON-BROWNE, L. **Experimental analysis of insect behavior**. New York: Springer-Verlag, 1974.

RINGO, J. Sexual receptivity in insects. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 45, p. 473-94, 1996. ISSN 0066-4170.

RUP, P. J. Mating and its behaviour in *Callosobruchus maculatus* (F.). **J. Stored Prod. Res.** New York, v. 22, n. 2, p. 77-79, 1986. ISSN 0022-474X.

_____; SHARMA, S. P. Behavioural response of male and female of *Callosobruchus maculatus* (F.) to the sex pheromone. **Indian J. Ecol.**, v. 1, p. 72-76, 1978. ISSN: 0304-5250.

SANT'ANA, J.; STEIN, K. Extração e identificação de substâncias bioativas de insetos In: FERREIRA, J. D. B; CORREIA A. G.; VIEIRA, P. C. **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos: Editora da UFSCR, 2001. p. 47-74.

SHU, S. et al. Sex pheromone production in *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) eletroantennographic and behavioral response. **J. Stored Prod. Res.**, New York, v. 32, p. 21-30, 1995. ISSN 0022-474X.

SILVA, A. et al. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil**: seus parasitos e predadores. Rio de Janeiro: Laboratório Central de Patologia Vegetal, 1968. v.1, pt. 2, p. 381.

SOLOMON, M. E. Archaeological records of storage pest: *Sitophilus granarius* from egyption pyramid tomb. **J. Stored Prod. Res.** New York, v. 1, p. 105-107, 1965. ISSN 0022-474X.

SILVERSTEIN, R. M; et al. Sex attractant of black carpet beetle. **Science**, Washington, v. 157, p. 85-87, 1967. ISSN 0036-8075.

SUZUKI, T.; MORI, K. (4R,8R)-(-)-4,8-dimethyldecanal: the natural aggregation pheromone of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Entomol. Exp. Appl.**, Amsterdam, v. 18, p. 134-136, 1983. ISSN 0013-8703.

TANAKA, Y. et al. Absolute configuration of a sex attractant the yellow meaworm, *Tenebrio molitor* L., **J. Pest. Science.**, v. 14, p. 197-202, 1989. ISSN: 1612-4766.

TANAKA, Y. et al. Copulation release pheromone, erectin, from the azuki bean weevil *Callosobruchus chinensis* L. **J. Pest. Science.**, v. 6, p. 75-82, 1981. ISSN: 1612-4766.

- TANAKA, Y. et al. A sex attractant of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L., and its role in the mating behavior. **J. Pest. Science.**, v. 11, p. 49-55, 1986. ISSN: 1612-4766.
- TSCHINKEL, W.; WILLSON, C.; BERN, H. A. Sex pheromone of the mealworm beetle (*Tenebrio molitor*). *J. Exp. Zool.*, Philadelphia, v. 164, p. 81-86, 1967. ISSN 0022-104X.
- VALENTINE, J. M. The olfactory sense of the adult mealworm beetle *Tenebrio molitor* (Linn.). *J. Exp. Zool.* Philadelphia, v. 58, p. 165-225, 1931. ISSN 0022-104X.
- VIANA, A. M. **Comportamento de agregação e acasalamento de *Cosmopolitus sordidus* (Coleoptera:Curculionidae) mediado por semioquímicos, em olfatômetro.** 1992. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 1992.
- VILELA, E. F; DELLA LUCIA, T. M. C. **Feromônio de insetos:** biologia, química e emprego no manejo de pragas. Ribeirão Preto: Holos, 1987.
- _____. _____. _____. 2. ed. Ribeirão Preto. Holos, 2001.
- WALLI, C. **Monitoring and timing.** London: John Wiley & Sons, 1989. p. 39-60.
- WANABE, T. et al. Integrated control of cigarette beetle (*Lasioderma serricorne* F.) with a synthetic sex pheromone and food attractant in the cigarette manufacturing factory. **Sci. Pap. Cent. Res. Inst. Japan Tob. Salt Public Corp.** n. 124, p. 23-32, 1982.
- WARD J. P. Mating behavior and the mechanism of male orientation in the anobidae bread beetle, *Stegobium paniceum*. **Entomology**, v. 6, p. 213-217, 1981. ISSN: 1365-2311.
- WONG, J.W. et al. Isolation and identification of two macrolide pheromones from the frass of *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: Cucujidae). **J. Chem. Ecol.**, New York, v. 9, p. 451-474, 1983. ISSN 0098-0331.
- WOOD, D. L. et al. **Control of insect behavior by natural products.** New York: Academic Press, 1970.
- ZARBIN, P. H. G. Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos. In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. **Feromônio de insetos:** biologia, química e emprego no manejo de pragas. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 147-150.
- _____. et al. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônio de insetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, p. 263-268, 1999. ISSN 0100-4042.