

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MERYBETH FERNANDEZ TRIANA

Ecologia química da broca-das-sementes de andiroba, *Hypsipyla ferrealis* (Hampson, 1929) (Lepidoptera: Phycitidae) e das pragas da cana-de-açúcar: broca-peluda, *Hyponeuma taltula* (Schs., 1904) (Lepidoptera: Erebidae) e broca-gigante, *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae)

Maceió  
2019

MERYBETH FERNANDEZ TRIANA

Ecologia química da broca-das-sementes de andiroba, *Hypsipyla ferrealis* (Hampson, 1929) (Lepidoptera: Phycitidae) e das pragas da cana-de-açúcar: broca-peluda, *Hyponeuma taltula* (Schs., 1904) (Lepidoptera: Erebidae) e broca-gigante, *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia na Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Recursos Naturais na linha de pesquisa em Purificação, caracterização e produção de insumos biotecnológicos em sistemas heterólogos

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio  
Goulart Santana

Maceió  
2019

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

F363e Fernenandez Triana, Merybeth.

Ecologia química da broca-das-sementes de andiroba, *Hypsipyla ferrealis* (Hampson, 1929) (Lepidoptera: Phycitidae) e das pragas da cana-de-açúcar: broca-peluda, *Hyponeuma taltula* (Schs., 1904) (Lepidoptera: Erebidae) e broca-gigante, *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae) / Merybeth Fernandez Triana. – 2019.  
118 f. : il. color.

Orientador: Antônio Euzébio Goulart Santana.

Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Ecologia química. 2. Pragas agrícolas. 3. Feromônio. 4. Glândula sexual. 5. Cana-de-açúcar. 6. Andiroba. 7. Broca-peluda. 8. Broca-gigante. I. Título.

CDU: 54:632.7

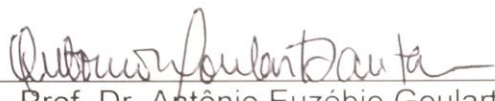
MERYBETH FERNANDEZ TRIANA

**Ecologia química da broca-das-sementes de andiroba, *Hypsipyla ferrealis* (Hampson, 1929) (Lepidoptera: Phycitidae) e das pragas da cana-de-açúcar: broca peluda, *Hyponomeuta talpula* (Schs., 1904) (Lepidoptera: Erebidae) e broca-gigante, *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae)**

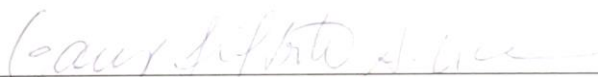
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

Aprovada em: 26/04/2019.

BANCA EXAMINADORA



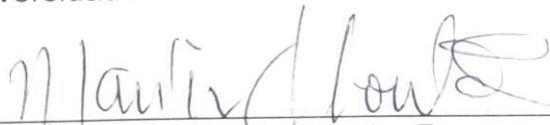
Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana  
Orientador - Universidade Federal de Alagoas - UFAL




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



Prof. Dr. Jorge Braz Torres  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE



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



Prof. Dr. Paulo Henrique Gorgatti Zarbin  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, pelo apoio, motivação e total confiança no meu trabalho, principalmente por abrir as portas de seu laboratório e guiarme na área da ecologia química.

Aos integrantes e exintegrantes do laboratório de ecologia química da Universidade Federal de Alagoas, pela sua ajuda e contribuição intelectual.

Aos professores do programa de posgraduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).

Ao Dr. Wittko Francke, da Universidade de Hamburgo, pela sua disposição e por fornecer alguns padrões usados neste trabalho.

Ao Dr. Christer Löfstedt, da Universidade de Lund pela sua disposição e por fornecer alguns padrões usados neste trabalho.

Ao Dr. Emiliano de Oliveira Barreto e M. Sc. Polliane Maria Cavalcante de Araújo, do Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Alagoas, pelo apoio na metodologia da análise histológica.

Ao M. Sc. Ana Rúbia Ribeiro e Dr. Eduardo Jorge S. Fonseca, do Laboratório de Óptica e Nanoscopia da Universidade Federal de Alagoas, pelo apoio na microscopia eletrônica de varredura da *T. licus*.

Ao Dr. Johnnatan Freitas e Jeniffer Freitas, do Laboratório de Microscopia do Instituto Federal de Alagoas, pelo apoio na microscopia eletrônica de varredura da *H. ferrealis*.

A Usina Agroindustrial Triunfo e à Usina Santo Antônio pelo fornecimento dos insetos e completa disposição para os testes de campo.

Ao Dr. Alexandre Jordão, do laboratório de entomologia de ecossistemas do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá

A coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) por financiar o desenvolvimento desta pesquisa

A Universidade Federal de Alagoas

A Rede Nordeste de Biotecnologia

## RESUMO

O entendimento do mecanismo da comunicação química de insetos praga tem permitido desenvolver metodologias alternativas para o monitoramento e o controle destas. Iscas contendo compostos como os feromônios sexuais são uma ferramenta do Manejo Integrado de Pragas amplamente exploradas nos últimos anos. Ainda, a identificação dos feromônios de Lepidoptera tem permitido levantar questões acerca do isolamento reprodutivo, seleção sexual, evolução, entre outras. O primeiro capítulo desta tese contribui para o entendimento da comunicação química na broca-gigante da cana-de-açúcar *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae). Poucas mariposas de Castniidae têm sido estudadas e algumas são consideradas importantes pragas agrícolas. Nesta espécie, relatamos a morfologia de seu sistema olfativo e estudamos a composição química de extratos corpóreos dos adultos. As antenas de *T. licus* têm seis tipos morfológicos de sensilas: sensilas tricoide, basicônica, caética, esquamiforme, coelocônica e auricíllica. O ovipositor não mostra evidência de glândula sexual, e nenhum composto específico da fêmea foi identificado a partir dele. Por outro lado, os machos liberam (*E,Z*)-2,13-octadecadienol e (*Z,E*)-2,13-octadecadienol. Estes compostos são conhecidos feromônios sexuais de fêmeas de Sesiidae e feromônios de machos de Castniidae; Assim, sugerimos que eles sirvam como feromônios de curto alcance em *T. licus*. O segundo capítulo estuda a composição do feromônio sexual da broca-peluda da cana-de-açúcar *Hyponeuma taltula* (Schaus, 1904) (Lepidoptera: Erebididae) composto por feromônios do tipo II. A mistura feromonal apresentou o (*9S,10R*)-epóxi-(*Z,Z*)-3,6-heneicosatrieno como componente majoritário e o (*Z,Z,Z*)-3,6,9-nonadecatrieno como componente minoritário na proporção 3:1, respectivamente. O terceiro capítulo abrange o estudo da comunicação química na *Hypsipyla ferrealis* Hampson, 1929 (Lepidoptera: Pyralidae) praga das sementes da andiroba *Carapa guianensis* Aub. (Meliaceae). Os danos causados pelas lagartas desta espécie afetam a regeneração da andiroba e o potencial de produção de óleo extraído das sementes, o qual compõe atividade econômica de comunidades locais. As antenas de machos de *H. ferrealis* têm maior área olfativa e apresentam dimorfismo sexual na morfologia das sensilas tricoide, caética, estilocônica, coelocônica e auricíllica. Por outro lado, a glândula sexual da fêmea se localiza dorsolateralmente na membrana intersegmental entre o oitavo e nono segmento abdominal e é responsável pela liberação dos compostos (*Z,E*)-9,12-teradecadienol e (*E*)-12-tetradecenol, prováveis componentes do feromônio sexual da *H. ferrealis*.

## ABSTRACT

The understanding of the chemical communication of pest insects has allowed developing alternative methodologies for monitoring and their control. Lures with compounds such as sex pheromones are an integrated pest management tool widely utilized in recent years. Furthermore, the identification of pheromones in Lepidoptera has allowed raising questions about the reproductive isolation, sexual selection, evolution, and etc. The first chapter of this thesis contributes to the understanding of chemical communication in the giant sugarcane borer, *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae). Few moths in the Castniidae have been studied and some are considered important agricultural pests. In this species, we report the morphology of its olfactory system and study the chemical composition of adult body extracts. The *T. licus* antennae have six morphological types of sensilla: trichoic, basiconic, chaetic, squamiform, choeloconic and auricillica. The ovipositor shows no evidence of a sexual gland, and no female-specific compound was identified from it. On the other hand, males release (*E,Z*)-2,13-octadecadienol and (*Z,E*)-2,13-octadecadienol. These compounds are known as female sex pheromones in the Sesiidae and male pheromones in Castniidae. Thus, we suggest that they serve as short-range pheromones in *T. licus*. The second chapter highlights the composition of the sex pheromone of sugarcane hairy borer, *Hyponeuma taltula* (Schaus, 1904) (Lepidoptera: Erebidae), which is composed of type II pheromones. The pheromone blend consists of (9*S*, 10*R*)-epoxy-(*Z,Z*)-3,6-heneicosatriene as the major component and the (*Z,Z,Z*)-3,6,9-nonadecatriene as a minor component, in a 3:1 ratio, respectively. The third chapter covers the study of chemical communication in *Hypsipyla ferrealis* Hampson, 1929 (Lepidoptera: Pyralidae), pest of andiroba seeds *Carapa guianensis* Aub. (Meliaceae). The damage caused by larvae of this species affects the regeneration of *C. guianensis* and the potential of oil production, which is an economic activity of the local communities. The male antennae of *H. ferrealis* have a larger olfactory area and show sexual dimorphism in the morphology of the trichoic, chaetic, styloconic, choeloconic and auricillica sensilla. On the other hand, the female sexual gland is located dorsolaterally on the intersegmental membrane between the eighth and ninth abdominal segment, being responsible for the release of the putative sex pheromone of *H. ferrealis*, (*Z,E*)-9,12-teradecadienol and (*E*)-12-tetradecenol.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1</b> - Broca-gigante e prejuízos causados em cana-de-açúcar .....	14
<b>Figura 2</b> - Ciclo de vida de <i>Telchin licus</i> (Lepidoptera: Castniidae) .....	15
<b>Figura 3</b> – Broca-peluda e prejuízos causados em cana-de-açúcar .....	18
<b>Figura 4</b> - Ciclo de vida de <i>Hyponeuma taltula</i> (Lepidoptera: Erebidae) .....	18
<b>Figura 5</b> – Broca-das-sementes-de-andiroba e prejuízos causados na andiroba.....	21
<b>Figura 6</b> - Ciclo de vida de <i>Hypsipyla ferrealis</i> (Lepidoptera: Pyralidae).....	21
<b>Figura 7</b> - Classificação dos Semioquímicos.....	23
<b>Figura 8</b> - Feromônios femininos representativos do Tipo I em lepidópteros .....	27
<b>Figura 9</b> - Feromônios femininos representativos do Tipo II em lepidópteros .....	28
<b>Figura 10</b> - Filogenia e feromônio sexual de fêmeas em lepidópteros .....	30
<b>Figura 11</b> - Estruturas químicas e nomenclatura de feromônios masculinos em lepidópteros	31
<b>Figura 12</b> - Sensilas de antenas de mariposas.....	37

### CAPÍTULO I

#### **Evidence of chemical communication in *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae): A morpho- and electrophysiological investigation**

<b>Fig 1.</b> The giant borer of sugarcane <i>Telchin licus</i> . .....	54
<b>Fig 2.</b> General morphology of male and female <i>Telchin licus</i> antennae. ....	55
<b>Fig 3.</b> Morpho-histological features of the ovipositor of <i>Telchin licus</i> . ....	59
<b>Fig 4.</b> Chromatogram of mid-leg segments of male <i>Telchin licus</i> . ....	62
<b>Fig 5.</b> Configuration assignment of 2,13-octadecadienol in the mid-legs from male <i>Telchin licus</i> . ....	63
<b>Fig 6.</b> Electroantennographic responses to male body extracts of <i>Telchin licus</i> . ....	64
<b>Fig 7.</b> Electroantennograms of male and female antenna of <i>Telchin licus</i> . ....	65
<b>S1 Fig 8.</b> Chromatograms of male legs <i>Telchin licus</i> . ....	77
<b>S2 Fig 9.</b> Legs of <i>Telchin licus</i> . ....	78



## CAPÍTULO II

### Componentes feromonais tipo II na glândula sexual de *Hyponeuma taltula* (Schs., 1904) (Lepidoptera: Erebidae)

- Figura - 1** GC-EAD do extrato de glândulas e padrões sintéticos em antenas de macho de *Hyponeuma taltula* configuração absoluta do Z3,Z6,epo9-21:H .....86
- Figura - 2** Espectro de massa do Z3,Z6,Z9-19:H, Z3,Z6,epo9-21:H e Z3,Z6,Z9-21:H presentes no extrato da glândula sexual de *Hyponeuma taltula* .....87
- Figura - 3** Respostas eletroantenográficas para diferentes dosagens de Z3,Z6,Z9-19:H e Z3,Z6,epo9-21:H (9S,10R) em antenas de macho de *Hyponeuma taltula*.....88

## CAPÍTULO III

### Aspectos da comunicação química intraespecífica da *Hypsipyla ferrealis* (Lepidoptera: Pyralidae): Estudos preliminares da composição do feromônio sexual e descrições morfológicas da antena e da glândula sexual

- Figura 1** - Morfologia da antena de macho e fêmea de *Hypsipylla ferrealis*.....100
- Figura 2** - Morfologia e histologia do ovipositor de *Hypsipyla ferrealis*. .....102
- Figura 3** – GC-EAD do extrato da glândula feromonal de *Hypsipyla ferrealis*. .....103
- Figura 4** – Espectro de massa dos compostos EAD ativos na glândula feromonal de *Hypsipyla ferrealis*. .....105
- Figura 5** – Coinjeção do Z9,E12-14:OH e E12-14:OH com o extrato glandular *Hypsipyla ferrealis* .....106

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

#### **Evidence of chemical communication in *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae): A morpho- and electrophysiological investigation**

<b>Table 1.</b> General characteristics of male and female <i>Telchin licus</i> antennae.....	55
<b>Table 2.</b> Morphological features of male and female <i>Telchin licus</i> antennal sensilla. ....	57
<b>Table 3.</b> Composition of male and female body extracts of <i>Telchin licus</i> . ....	60
<b>Table 4.</b> Kovats indices for synthetic and natural 2,13-octadecadienol diastereoisomers in different polarity columns.....	63

### CAPÍTULO III

#### **Aspectos da comunicação química intraespecífica da *Hypsipyla ferrealis* (Lepidoptera: Pyralidae): Estudos preliminares da composição do feromônio sexual e descrições morfológicas da antena e da glândula sexual**

<b>Tabela 1</b> - Características gerais da antena de <i>Hypsipyla ferrealis</i> .....	99
<b>Tabela 2</b> – Caracterização morfométrica das sensilas das antenas de fêmea e macho de <i>Hypsipyla ferrealis</i> . ....	101
<b>Tabela 3</b> – Composição química dos extratos da glândula sexual de <i>Hypsipyla ferrealis</i> ....	104

## SUMÁRIO

1.	REVISÃO DE LITERATURA .....	13
1.1.	A cultura da cana-de-açúcar .....	13
1.2.	<i>Telchin licus</i> (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae) .....	13
1.3.	<i>Hyponeuma taltula</i> (Schaus, 1904) (Lepidoptera: Erebidae: Herminiinae).....	16
1.4.	Cultura de andiroba .....	19
1.5.	<i>Hypsipyla ferrealis</i> (Hampson, 1929) (Lepidoptera: Pyralidae).....	20
1.6.	Controle de pragas por comportamento .....	22
1.6.1.	Monitoramento .....	23
1.6.2.	Coleta massal .....	24
1.6.3.	Disrupção sexual .....	24
1.6.4.	Vantagens do uso de semioquímicos .....	26
1.7.	Glândulas produtoras de feromônio .....	26
1.8.	Feromônios sexuais em fêmeas de lepidópteros .....	27
1.9.	Feromônios sexuais em machos de lepidópteros .....	29
1.10.	Feromônios sexuais de Castniidae .....	32
1.11.	Feromônios sexuais da subfamília Herminiinae (Lepidoptera: Erebidae).....	34
1.12.	Feromônios sexuais da subfamília Phycitinae (Lepidoptera: Pyralidae) .....	35
1.13.	Sensilas em lepidópteros .....	36
2.	REFERÊNCIAS .....	37
	<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>48</b>
	<b>Evidence of chemical communication in <i>Telchin licus</i> (Lepidoptera: Castniidae): A morpho- and electrophysiological investigation</b>	
1.	ABSTRACT .....	49
2.	INTRODUCTION .....	49
3.	MATERIALS AND METHODS .....	50

3.1.	Insect collection and maintenance .....	50
3.2.	Scanning electron microscopy .....	51
3.3.	Light microscopy .....	51
3.4.	Compound extraction .....	51
3.5.	Electroantennogram recordings .....	51
3.6.	Chromatographic analyzes .....	52
3.7.	Standards .....	53
4.	RESULTS .....	54
4.1.	Morphological analysis of antennae .....	54
4.2.	Morpho-histological analysis of the ovipositor .....	58
4.3.	Chemical composition of <i>T. licus</i> body extracts .....	59
4.4.	EAG Analysis .....	63
5.	DISCUSSION .....	65
5.1.	Morphological analysis of antennae .....	65
5.2.	Morpho-histological analysis of the ovipositor .....	67
5.3.	Chemical composition of <i>T. licus</i> body extracts .....	67
6.	REFERENCES.....	71
7.	SUPPORTING INFORMATION .....	77
<b>CAPÍTULO II .....</b>		<b>79</b>
<b>Componentes feromonais tipo II na glândula sexual de <i>Hyponeuma taltula</i> (Schs., 1904)</b>		
<b>(Lepidoptera: Erebidæ)</b>		
1.	RESUMO .....	80
2.	INTRODUÇÃO .....	80
3.	MATERIAL E MÉTODOS .....	81
3.1.	Insetos .....	81

	12
3.2. Extração de compostos feromonais.....	82
3.3. Análises Cromatográficas .....	82
3.4. Eletroantenografia .....	84
3.5. Testes de campo .....	84
3.6. Padrões .....	85
4. RESULTADOS.....	85
5. DISCUSÃO.....	88
6. REFÊRENCIAS.....	91
<b>CAPITULO III.....</b>	<b>94</b>
 <b>Aspectos da comunicação química intraespecífica da <i>Hypsipyla ferrealis</i></b> <b>(Lepidoptera: Pyralidae): Estudos preliminares da composição do feromônio</b> <b>sexual e descrições morfológicas da antena e da glândula sexual</b>	
1. RESUMO .....	95
2. INTRODUÇÃO .....	95
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	96
3.1. Insetos .....	96
3.2. Morfologia das antenas e ovipositor .....	97
3.3. Histologia do ovipositor.....	97
3.4. Extração da glândula feromonal.....	97
3.5. Análises Cromatográficas .....	98
4. RESULTADOS.....	99
4.1. Morfologia geral da antena .....	99
4.2. Diferentes tipos de sensilas antenais .....	100
4.3. Morfologia e histologia do ovipositor.....	102
4.4. Composição da glândula feromonal.....	103
5. DISCUSÃO.....	106
6. REFERÊNCIAS.....	112

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum* Linnaeus, 1753 (Poaceae), e seus derivados têm grande importância para a economia brasileira, sendo o Brasil responsável por mais da metade da quantidade de etanol comercializado no mundo. Com estimativa de produção de 633,26 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2017/2018, com 54,6% desse total destinado à produção de etanol e o restante à produção de açúcar. No levantamento de abril de 2018, a área colhida com cana-de-açúcar no Brasil foi de 8,7 milhões de hectares, com as regiões Norte e Nordeste sendo responsáveis por 7,0% da produção total, enquanto que 92,9% foi produzido na região Centro-Sul do Brasil.<sup>1</sup>

A cana-de-açúcar é cultivada como monocultura e, assim, forma um agroecossistema que permite a presença de diversos insetos fitófagos que se tornam pragas.<sup>2</sup> No mundo são relatadas mais de 1500 espécies de insetos que se alimentam de *S. officinarum*.<sup>3</sup> Porém, no Brasil, dentre as pragas mais importantes encontram-se os que atacam a base do colmo como a cigarrinha-da-raiz *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae), migdolo *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae), bicudo-da-cana *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae), broca-peluda *Hyponeuma taltula* Schaus, 1904 (Lepidoptera: Erebididae), lagarta-elasm *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae), *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858) (Isoptera: Rhinotermitidae), *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) e o percevejo-castanho *Scaptocoris castanea* Perty, 1830 (Hemiptera: Cydnidae). Das pragas da parte aérea pode-se relacionar a broca-da-cana *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), broca-pequena-da-cana *Diatraea flavipennella* Box, 1931 (Lepidoptera: Crambidae), broca-gigante *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae), formigas saúvas *Atta spp* (Hymenoptera: Formicidae), cigarrinha-das-folhas *Mahanarva posticata* (Stal, 1855) (Hemiptera: Cercopidae) e o besouro-rajado-da-cana *Metamasius hemipterus* Linnaeus, 1765 (Coleoptera: Curculionidae).<sup>4;5</sup>

### 1.2. *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae)

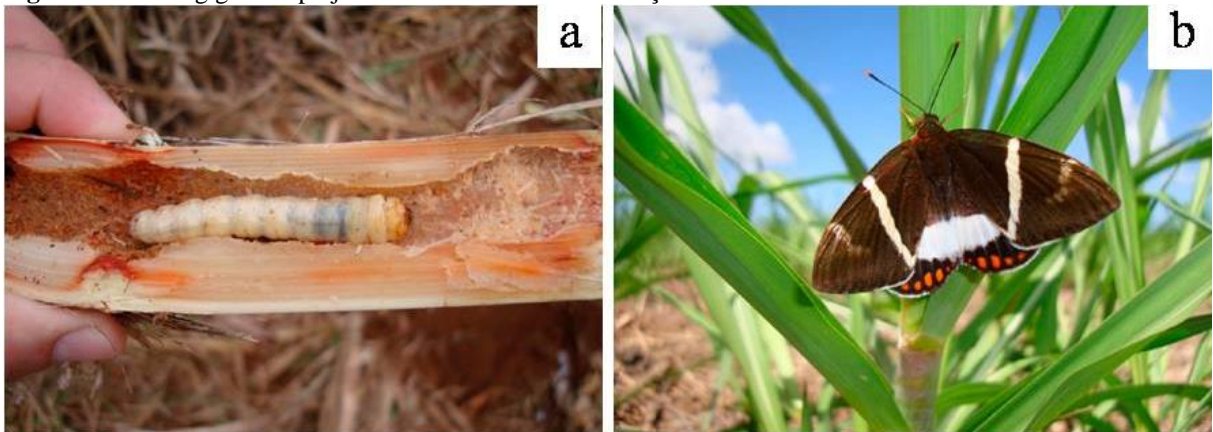
A broca-gigante da cana-de-açúcar *Telchin. licus*, conhecida anteriormente como *Castnia licus*, esta distribuída na América central e do Sul, principalmente, na Costa Rica, Panamá, Trindade e Tobago, Nicarágua, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Equador, Peru, Paraguai, Bolívia e Brasil.<sup>6-10</sup>

No Brasil, a primeira ocorrência de *T. licus* foi relatada na região nordeste em 1927.<sup>11</sup> Em 2007, Almeida et al. (2015) relataram por primeira vez a presença de *T. licus* atacando plantios no estado de São Paulo, desde então registros foram realizados para o Acre, Alagoas, Amazonas, Bahia, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rondônia e São Paulo.<sup>13;14</sup>

Atualmente Castniidae pertence ao grupo Cossoidea e Sesiioidea das famílias de lepidópteros.<sup>15</sup> Dados morfológicos junto com informações moleculares organiza às famílias Sesiidae, Castniidae e Brachodidae dentro da superfamília Sesiioidea.<sup>16</sup> No entanto, alguns estudos moleculares não encontraram evidência para uma relação próxima entre Sesiidae e Castniidae,<sup>17</sup> deixando assim, a relação taxonômica da família Castniidae não esclarecida.

As lagartas de *T. licus* são brocas que se alimentam do colmo, pseudocaule e rizoma de espécies cultivadas como cana-de-açúcar, abacaxi e bananeira.<sup>18;19</sup> Na cana-de-açúcar, as lagartas perfuram o colmo internamente formando galerias, provocando a morte da gema apical, conhecido como “coração morto”, provocam a perda de peso e facilitam a penetração de fungos que causam a podridão-vermelha (*Colletotrichum falcatum* Went e *Fusarium moniliforme* Sheld), que invertem a sacarose, diminuindo a produção de açúcar (Figura 1a). Logo após o corte da cana, a lagarta passa a viver protegida na touceira, alimentando-se do rizoma, debilitando e reduzindo o poder germinativo da touceira.<sup>13;20</sup>

**Figura 1** - Broca-gigante e prejuízos causados em cana-de-açúcar



Nota: (a). Lagarta de *T. licus* no interior do colmo de cana-de-açúcar. (b) Adulto de *T. licus*.

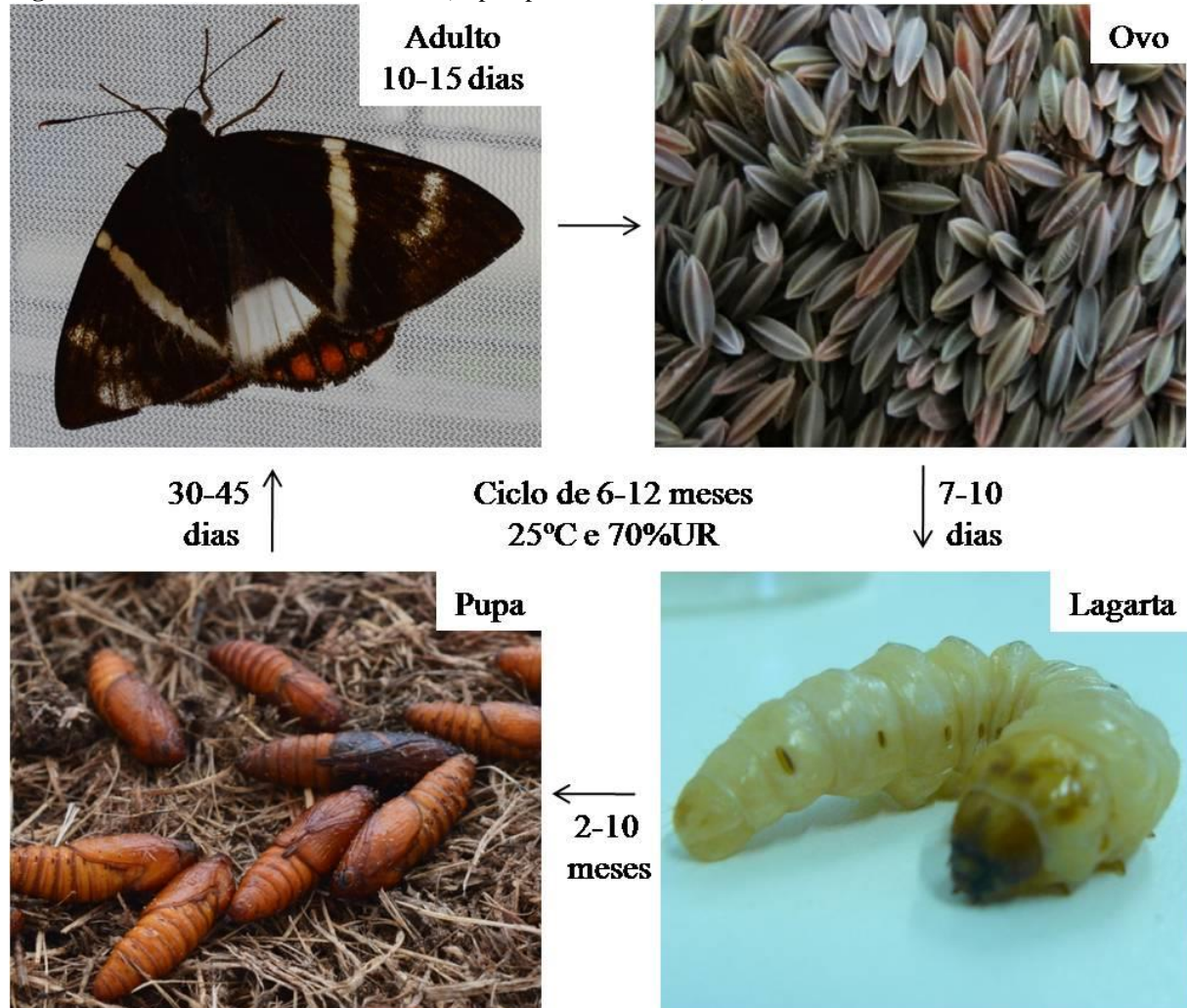
Fonte: José F.Garcia

A *T. licus* é uma mariposa de hábitos diurnos, voam nos horários mais quentes do dia entre 12:00 e 14:00 h. Os adultos medem aproximadamente 35 mm de comprimento e 90 mm de envergadura alar,<sup>2</sup> as asas anteriores são de cor castanho escuro, com reflexos metálicos e furta-cor e as asas posteriores são castanho escuro, branco e laranja.<sup>21</sup> (Figura 1b). A

longevidade do adulto é de 10 a 15 dias, e após acasalamento, as fêmeas fazem postura na base das touceiras, com fecundidade de 50 a 100 ovos.<sup>2</sup>

O ciclo biológico completo de *T. licus*, varia muito e depende de fatores como umidade, temperatura e alimentação podendo levar de 6 a 12 meses de duração.<sup>22</sup> Os ovos são verdes ou marrons com estrutura poliédrica, comprimento de ~4 mm e período de incubação entre 7 e 14 dias, as lagartas possuem coloração branco leitosa, podem chegar a ter comprimentos de 80 mm e largura de 12 mm, as lagartas passam por 5 instares e o período larval é aproximadamente de 10 meses (25°C e 70%UR).<sup>22</sup> As pupas são de coloração castanho escuro e estão dentro de um casulo de fibras feito da cana-de-açúcar e chegam a medir até 4 cm de comprimento, esse estágio pode durar de 30 a 45 dias.<sup>21;22</sup> (Figura 2)

**Figura 2** - Ciclo de vida de *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae)



Fonte: Autora, 2018 (Adulto, pupa e lagarta); José F.Garcia (Ovos)

Diversos métodos para o controle de *T. licus* tem sido testados. No controle químico existem dois produtos registrados atualmente<sup>23</sup> o Altacor® (DuPont do Brasil S.A.), com ingrediente ativo clorantraniliprol e o Krismat WG (Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.),



com ingredientes ativos do grupo das triazinas e sulfoniluréia. O Altacor vem sendo aplicado no Nordeste, no entanto o controle não tem sido satisfatório.<sup>20</sup> Adicionalmente, estudos em laboratório com fipronil, princípio ativo de Regent<sup>®</sup> 800 WG, demonstraram ser eficientes em concentração de 500 g/ha.<sup>24</sup>

No controle biológico de *T. licus*, vários estudos tem obtido resultados promissórios. Taxas de mortalidade das lagartas entre 30 e 80% são observados quando usando o fungo *B. bassiana* logo após o corte da cana-de-açúcar.<sup>13;25</sup> De igual forma isolados de *M. anisopliae* atingiram taxa de mortalidade entre 43 e 80%.<sup>25</sup> Deste modo estes fungos tem potencial para o controle de *T. licus*.

Inimigos naturais eficientes na redução das populações de *T. licus*, em qualquer das fases do seu desenvolvimento não são conhecidos. O controle natural da *T. licus* restringe-se à atividade de algumas aves que se alimentam desta após a colheita da cana-de-açúcar.<sup>13</sup>

O uso de variedades de cana-de-açúcar geneticamente modificadas também tem sido proposto para combater *T. licus*. Efeitos da proteína Cry (*B. thuringiensis*) nas lagartas da broca-gigante têm demonstrado resultados promissórios para futuramente desenvolver variedades resistentes de cana-de-açúcar.<sup>26</sup>

O controle mecânico é o mais empregado na região Nordeste para o controle de *T. licus*, este consiste na retirada dos rizomas infestados e catação manual de lagartas e pupas mediante o uso de enxadeco. Se utilizado em larga escala, pode contribuir para a redução da população da praga, no entanto o método é muito laborioso e oneroso.<sup>13;20</sup>

### **1.3. *Hyponeuma taltula* (Schaus, 1904) (Lepidoptera: Erebiidae: Herminiinae)**

Esta mariposa está presente apenas no Brasil, catalogada em 1904 pelo entomólogo William Schaus como *H. taltula*, usando espécimens de São Paulo, e posteriormente com espécimens encontradas em Castro-PR foi denominada com o sinônimo *Hyponeuma leucanioides*.<sup>27</sup> Em 1989 o gênero *Hyponeuma* foi catalogado dentro da subfamília Herminiinae de Noctuidae no catalogo de lepidópteros publicado nos Estados Unidos.<sup>28</sup> Em 2011 a subfamília Herminiinae foi classificada como Erebiidae dos Noctuoideas.<sup>29</sup>

Em 1973 foi relatada pela primeira vez a ocorrência desta espécie em canaviais de São Paulo e Pernambuco.<sup>30</sup> Em 1984 foi constatada sua presença em canaviais do norte fluminense<sup>31</sup> e 18 anos depois foi reportada nas regiões Sul e Centro-Oeste.<sup>32</sup> Em 2003 observou-se em grande quantidade e distribuição nas áreas de cultivo da Usina Terra Nova (Pilar, Alagoas).<sup>33</sup> Em 2010 foi observada uma alta incidência deste inseto em Niviraí e

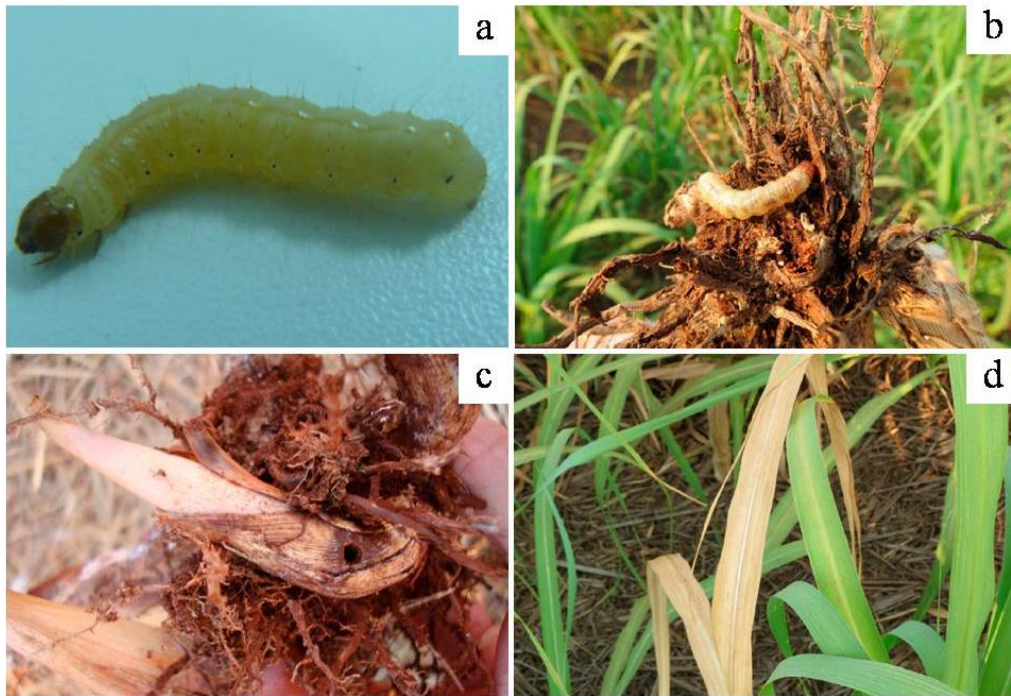
Maracaju, Mato Grosso do Sul.<sup>34</sup> Nas últimas safras de cana-de-açúcar do Nordeste do Brasil, as espécies *T. licus* e *H. taltula* tem se constituído como um desafiante problema fitossanitário em toda a região canavieira.<sup>35</sup>

Denominada popularmente como broca-peluda da cana-de-açúcar, pelas longas setas distribuídas no corpo das lagartas (Figura 3a), foi reconhecida inicialmente como praga por provocar danos similares aos causados por *Metamasius* sp. Horn, 1873 (Coleoptera: Dryophthoridae).<sup>30</sup>

As mariposas depositam seus ovos na base das plantas ou no palhiço sobre o solo e, ao eclodirem, as lagartas localizam-se na base das touceiras, no sistema radicular (Figura 3b), onde se alimentam dos rizomas e dos primeiros internódios basais (Figura 3c). Em plantas novas causam a morte da gema apical, sintoma conhecido como “coração morto” e evidenciado pelo amarelecimento, secagem e possível morte de perfilhos (Figura 3d). Já em plantas adultas, ocasionam perda de peso, brotação lateral, enraizamento aéreo, canas quebradas.<sup>36;37</sup> Além disso, danos indiretos envolvendo a entrada de fungos pelos orifícios têm ocasionado podridões, que resultam em diminuição do rendimento industrial devido a problemas de contaminação no processo da fermentação alcoólica.<sup>35</sup>

O ciclo de vida de *H. taltula* em laboratório, a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 60% de UR e fotofase de 14 horas, é completado em 80 dias, conforme mostrado na Figura 4. Os ovos colocados de forma individualizada no solo pelas fêmeas permanecem neste estado por 5.5 dias, até a eclosão das lagartas as quais tem um desenvolvimento de 53.5 dias e a fase de pupa permanece por 13.5 dias. A longevidade dos adultos é de 5 a 6 dias e cada fêmea tem uma fecundidade diária de 85 ovos, totalizando fecundidade de 425 ovos por fêmea.<sup>33</sup>

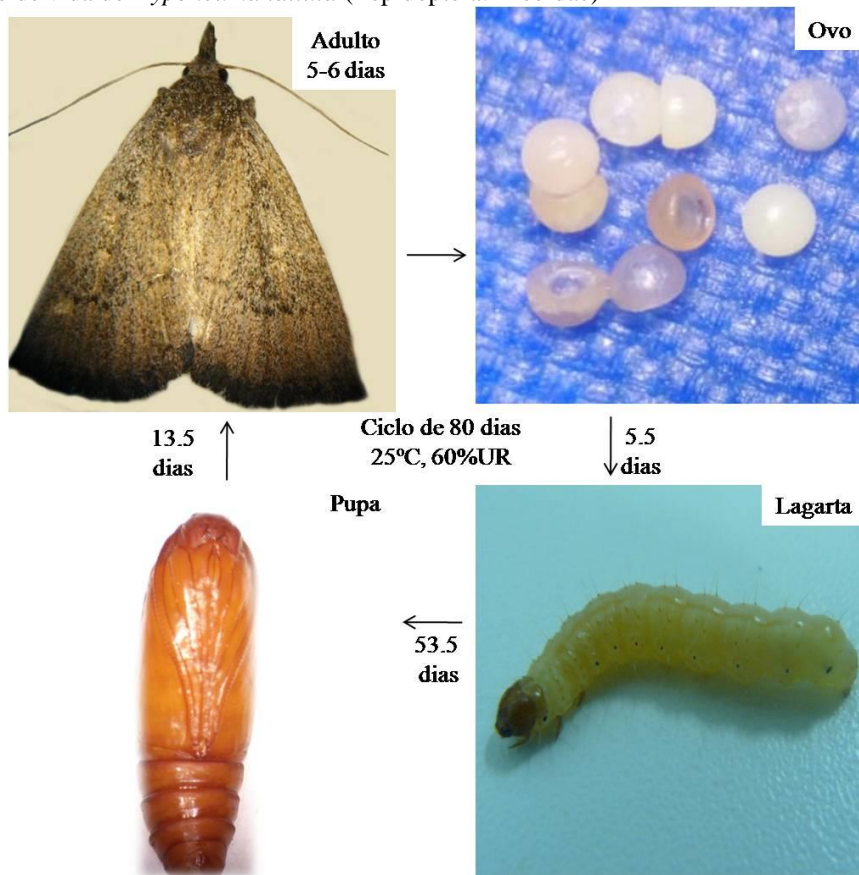
**Figura 3** – Broca-peluda e prejuízos causados em cana-de-açúcar



Nota: (a) Lagarta de *H. taltula*. (b) Lagarta na base da touceira. (c) Broto inicial perfurado por lagarta *H.taltula*. (d) Sintoma de ataque “Coração morto”.

Fonte: (a) Autora,2014, (b-d) José F.Garcia

**Figura 4** - Ciclo de vida de *Hyponeuma taltula* (Lepidoptera: Erebidae)



Fonte: Autora, 2018.

Zenker et al. (2007) descrevem a morfologia das fases imaturas em *H. taltula* com espécies coletadas em Usina Triunfo (Boca da Mata - AL). Os ovos apresentam um formato subpiramidal, não muito comum em herminíneos. As larvas são de coloração de fundo branca sem listras. As pupas são do tipo obtecta nas quais as partes do corpo do adulto são observadas, mas as partes externas como patas, antenas e asas encontram-se juntas ao corpo, a coloração inicial é marrom clara e com o desenvolvimento adquirem uma coloração mais escura.

O controle mais utilizado para *H. taltula* foi o químico com aplicação de inseticidas temik e carbofurano (Atualmente proibidos - Furadam<sup>®</sup>) na linha e na entrelinha da cana-de-açúcar na Usina Maracaju – MS.<sup>32;37</sup> Também foi estudada a eficiência dos inseticidas Tiametoxam (Actara<sup>®</sup>) e Clorantranilipole na Usina Triunfo Agroindustrial, Boca da Mata – AL, obtendo tão só um aumento de 14 a 23% no número de colmos sadios.<sup>35</sup> De igual forma, Rodrigues, Pinto e Segato (2012) reportam que os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Boveriz<sup>®</sup> Biocontrol) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok (Metarriz<sup>®</sup> Biocontrol) não foram eficazes no controle da broca-peluda, mas que o tiametoxam (Actara<sup>®</sup> 250 WG) causou redução de 93,4% aos 28 dias após a aplicação em Ribeirão Preto, SP. Uma patente sobre o uso de genes CRY do *Bacillus thuringiensis* relata *H. taltula* como uma das pragas que pode ser controlada com esta modificação nas plantas.<sup>40</sup>

No entanto, Dario et al. (2014) relatam que não há inseticidas eficientes registrados para o controle desta praga e a principal metodologia adotada de controle é a catação manual das lagartas, que é onerosa e pouco adequada.

#### 1.4. Cultura de andiroba

Existem quatro espécies denominadas andiroba: *Carapa guianensis* (Aublet, 1776), *Carapa megistocarpa* (Styles, 1981), *Carapa procera* (Pennington, 1981) e *Carapa akuri* (Forget, 2009). A *C. guianensis* pertence à família Meliaceae, mesma família do mogno (*Swietenia macrophylla*) e cedro (*Cedrela sp.*).

A *C. guianensis* é uma árvore perenifólia e monoica de até 55 m de altura, o fruto é uma cápsula com quatro valvas que pode conter entre 1 a 16 sementes. A semente é marrom, apresenta grande variação de forma e tamanho; pesa entre 1 e 70 g e mede entre 1 e 6 cm de comprimento.<sup>41</sup>

A *C. guianensis* ocorre com bastante frequência dentro da bacia Amazônica.<sup>41-44</sup> Fora do Brasil ocorre no sul da América Central, América do sul e África.<sup>45;46</sup> A andiroba possui

adaptação a diferentes tipos de ambientes, o que faz com que ocorra tanto em áreas alagadas (várzeas) como em formações de terra firme.<sup>45;46</sup>

A andiroba é uma das espécies florestais da Amazônia capaz de promover a valorização e o uso econômico da floresta. Ela pode ser utilizada tanto na indústria madeireira como na produção de óleo das sementes. O óleo extraído das sementes é a matéria prima de vários produtos farmacêuticos e cosméticos comercializados no Brasil. No entanto, A predação por lagartas do gênero *Hypsipyla*<sup>47</sup> principalmente pela espécie *Hypsipyla ferrealis* (Hampson) (Lepidoptera: Pyralidae)<sup>48</sup> causa danos diretos na qualidade das sementes, observando a perda do potencial de produção de óleo e afeta a regeneração da espécie.<sup>42</sup>

### 1.5. *Hypsipyla ferrealis* (Hampson, 1929) (Lepidoptera: Pyralidae)

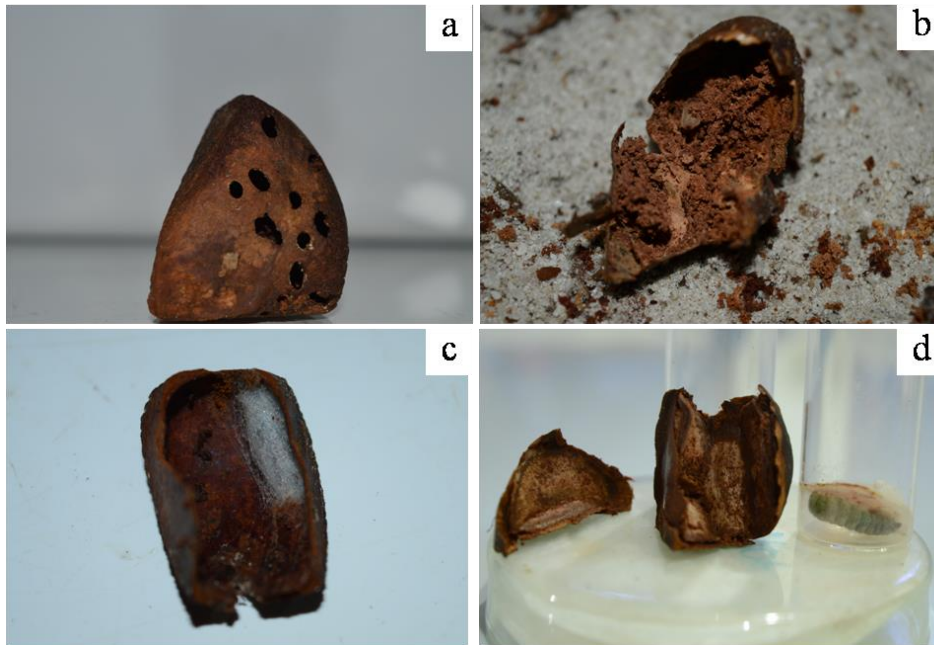
As lagartas de *H. ferrealis* são brancas, levemente acinzentadas, no último estágio com tonalidade rósea e azul, essas alimentam-se dos cotilédones das sementes. Antes de formar o casulo abandonam a semente ou constroem uma câmara pupal tão rígida quanto o tegumento da semente, num dos ângulos internos de uma aresta ou vértice da semente (Figura 5).<sup>49</sup>

As lagartas desta espécie são tolerantes a conviver em grupos, encontrando-se em média 9 lagartas por semente atacada, e não apresentam comportamento de canibalismo.<sup>50</sup>

O ciclo completo de *H. ferrealis* (Figura 6), desde a oviposição até a emergência é aproximadamente 36 dias.<sup>50</sup> O ovo emerge após cinco dias e a fase larval tem um período de 22-29 dias. Durante a fase pupal as lagartas que abandonam a semente formam o casulo no solo entre a folhagem, e esta fase acontece em média de 11 dias. O casulo é denso e tem alto conteúdo de óleo, tornando-o impermeável e protegendo a pupa do solo alagado. Fêmeas e machos emergem ao mesmo tempo.<sup>50</sup>

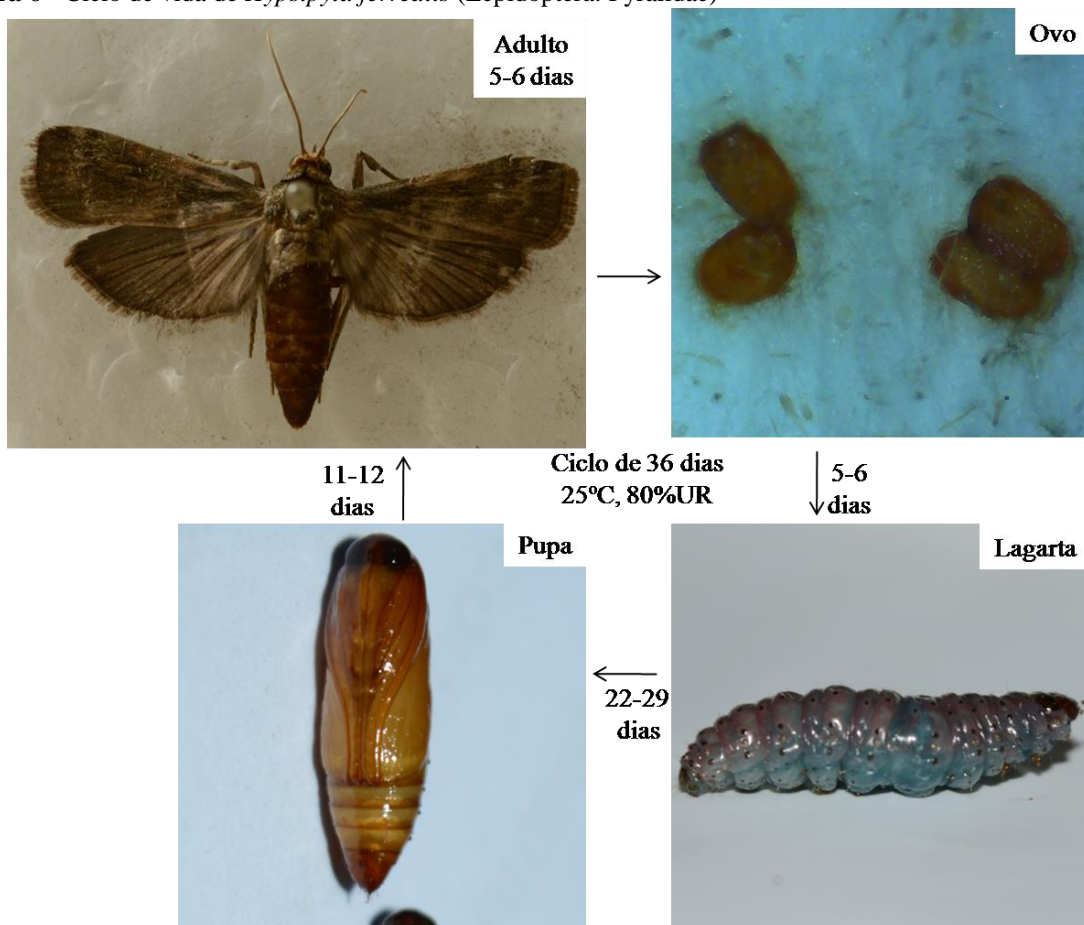
Vários estudos foram desenvolvidos com o intuito de estabelecer metodologias de controle para a *Hypsipyla grandella* (Zeller, 1848) e *Hypsipyla robusta* (Moore, [1886]), como desenvolvimento de plantas resistentes, além de controle químico, biológico e silvicultural.<sup>43-46</sup> No entanto, estas tecnologias de controle não têm sido aplicadas ou estudadas para *H. ferrealis*.

**Figura 5** – Broca-das-sementes-de-andiroba e prejuízos causados na andiroba



Nota: (a) Semente brocada de andiroba. (b) Injúria gerada pela *H. ferrealis*. (c) Casulo da pupa de *H. ferrealis* dentro da semente de andiroba. (d) Lagarta de *H. ferrealis* em diapausa  
 Fonte: Autora, 2016

**Figura 6** - Ciclo de vida de *Hypsipyla ferrealis* (Lepidoptera: Pyralidae)



Fonte: Autora, 2018.

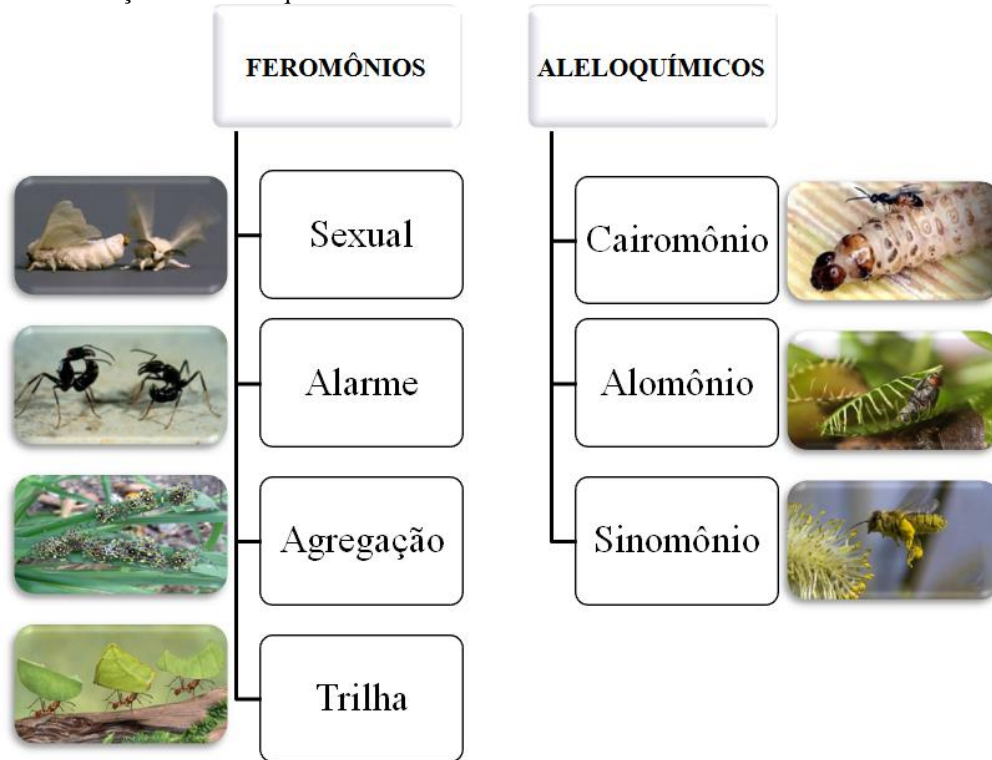
Visto que estas espécies são pragas de culturas relevantes, é importante a constante implementação de métodos para o controle e monitoramento destas. No entanto, o uso de inseticida elimina os inimigos naturais e acarreta, ao longo do tempo, no surgimento de populações de insetos resistentes.<sup>51</sup> Adicionalmente, o hábito alimentar das brocas dificulta seu controle mediante agroquímicos, já que estas permanecem no colmo, nos rizomas ou nas sementes das culturas e usualmente bloqueiam suas entradas com resíduos de seda e matéria orgânica, o que evita seu contato com o agrotóxico. Portanto, faz-se necessária a implementação de outros métodos de controle mais eficientes e menos laboriosos que o controle mecânico, como o controle biológico ou o controle por comportamento, que são aplicados na fase adulta do inseto através o uso de semioquímicos. Entretanto, este último não tem sido utilizado para as pragas *H. taltula*, *T. licus* em cana-de-açúcar e *H. ferrealis* em andiroba.

#### **1.6. Controle de pragas por comportamento**

O método de controle por comportamento é uma estratégia no manejo integrado de pragas que pode ser considerado como uma abordagem alternativa ou complementar aos tratamentos com inseticidas.<sup>52</sup> O método é baseado no uso de semioquímicos. Os insetos utilizam compostos químicos na sua comunicação para a localização de presas, defesa, seleção de plantas hospedeiras, escolha de locais de oviposição, acasalamento, organização das atividades sociais e outros tipos de comportamento.<sup>53</sup> Os semioquímicos são classificados com base no tipo de interação (Figura 7): aleloquímicos são compostos que mediam as relações interespecíficas, ou seja, os comportamentos de indivíduos de espécies diferentes, e os feromônios estão presentes nas interações intraespecíficas.<sup>54</sup>

Os aleloquímicos são classificados dependendo dos custos e benefícios de cada organismo. Os alomônios favorecem o organismo emissor, mas não o receptor como é o caso das plantas carnívoras que secretam substâncias para atrair as suas presas. Os kairomônios são os semioquímicos que favorecem o organismo receptor, mas não o emissor, por exemplo, os compostos atraentes de parasitóides, e os sinomônios favorecem ao organismo emissor e ao receptor como acontece no processo da polinização.<sup>54</sup>

**Figura 7** - Classificação dos Semioquímicos



Shani (2000) relata que os feromônios sexuais têm sido mais minuciosamente estudados devido à maior eficácia no controle de pragas, seguidos, em menor grau pelos feromônios de agregação e de alarme. O uso de feromônios no manejo integrado de pragas pode ser usado para o monitoramento, a coleta em massa e a confusão sexual.<sup>55</sup>

#### 1.6.1. Monitoramento

Trematerra (2013) relata que o monitoramento determina quando a população do inseto-praga atingiu o nível de dano econômico, indicando de maneira mais precisa o momento de controle, e limitado assim a utilização desnecessária de inseticida, já que o método detecta tanto a presença quanto a densidade da praga. Por exemplo, Jyothi et al.(2014) monitoraram a praga do algodoeiro *Earias vitella* Sherborn, 1902 (Lepidoptera: Nolidae) com iscas de feromônio da espécie, determinando que a maior presença da mariposa acontece no período chuvoso do ano, de abril a outubro na Índia. O monitoramento com feromônio também pode definir a distribuição do inseto na área e no tempo. Diaz-gomez et al. (2012) estudaram no México a flutuação populacional de *Copitarsia decolora* Guenée, 1852 (Lepidoptera: Noctuidae), uma praga importante em diversas culturas, encontrando um pico de ocorrência em março. Da mesma maneira, Merrill et al. (2011) relataram a variabilidade espacial do macho adulto de *Striacosta albicosta* (Smith, 1888) (Lepidoptera: Noctuidae) em



campos de milho do Colorado, Estados Unidos da América, encontrando uma maior abundância do inseto nos bordos limites da cultura.

### 1.6.2. Coleta massal

Na coleta massal o feromônio é usado como atrativo do inseto para um recipiente de contenção, visando sua eliminação com conseqüente diminuição do número de inseto-praga no cultivo.<sup>55</sup> A densidade, eficiência e o poder de atração das iscas devem ser suficientes para capturar uma quantidade apreciável de insetos que reduza o dano econômico.<sup>60</sup> Trematerra (2012) relata que a coleta massal com feromônios requer estudos complexos que determinem a quantidade de iscas por área para que os acasalamentos não tenham sucesso, além disto a biologia dos insetos pode tornar pouco eficaz o método, como no caso de *Plodia interpunctella* (Hübner, 1813) (Lepidoptera: Pyralidae), uma vez que os machos desta mariposa podem acasalar com cerca de 6-10 fêmeas durante seu período de vida. Portanto, até 90% da população masculina pode ser capturada sem afetar o número de fêmeas acasaladas de modo que em populações muito altas da praga este método não é eficaz. Por outro lado, a coleta massal para ambos os sexos usando feromônios de agregação é mais eficiente que a coleta selectiva de sexo.<sup>61</sup>

Trematerra e Gentile (2010) apresentam ótimos resultados na redução e manutenção a um nível abaixo do dano econômico da praga dos cereais *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879 (Lepidoptera: Pyralidae), com técnicas de coleta em massa com acetato de (Z,E)-9,12-tetradecadienila como feromônio sintético e acompanhado por tratamentos localizados de inseticida e limpeza cuidadosa de vários departamentos e de todos os equipamentos. De igual forma, Navarro et al. (2002) reportam o uso de feromônio de agregação (6-metil-2-hepten-4-ol) para a coleta em massa da broca-do-olho-do-coqueiro, *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus 1764) (Coleoptera: Curculionidae), atraindo machos e fêmeas e reduzindo assim a população da praga no coqueiro.

### 1.6.3. Disrupção sexual

A interrupção de acasalamento baseia-se na interferência ou impedimento da transmissão de sinais químicos entre os parceiros sexuais. Isto tem sido obtido com a liberação de uma quantidade maior de feromônio sintético na atmosfera, para diminuir ou impedir que os insetos localizem seu respectivo parceiro e, dessa forma, reduzir o acasalamento.<sup>55</sup> Os mecanismos para o funcionamento desta técnica envolvem a exposição ao feromônio por longos períodos para afetar os órgãos sensoriais ou o sistema nervoso do

inseto, encobrir o rastro do chamamento das fêmeas ou impedindo que o sistema de detecção do macho para localizar a fêmea não funcione corretamente, além do gasto de energia e tempo dos insetos seguindo falsas fontes de feromônios.<sup>64</sup>

Comumente, o feromônio de muitos insetos apresenta mais de um componente e em muitas espécies essa composição é a mesma. No entanto, as proporções diferentes são responsáveis por sua distinção pelos insetos.<sup>53</sup> Por isso, se um único componente do feromônio ou uma alteração na proporção dos componentes for libertado, os machos não serão capazes de detectar ou localizar a mistura de feromônio liberado pelas fêmeas.<sup>61</sup>

Outra metodologia usada nos últimos anos para a interrupção do acasalamento é o sistema de auto-confusão sexual. Por exemplo, esta metodologia usa partículas eletrostaticamente carregadas que servem como transporte de feromônios ou qualquer outro ingrediente ativo e são aderidas às cutículas dos insetos. No caso de lepidópteros, os machos são atraídos para as fontes de feromônio e as partículas são aderidas ao corpo, perturbando assim a sua capacidade de localizar mariposas fêmeas e tornando-os fontes atraentes para outros machos.<sup>65</sup> Trematerra (2012) indica que é essencial conhecer os mecanismos envolvidos na interrupção do acasalamento já que disso dependem as formulações adequadas dos feromônios e uma das limitações desta técnica é a exigência de quantidades grandes de semioquímicos.

A interrupção do acasalamento mediante o uso de feromônios tem sido uma das técnicas mais acolhidas pelo controle de pragas e enumeráveis exemplos podem ser citados.<sup>57-59;66</sup> Dentre eles Cocco, Deliperi e Delrio (2012) relatam a eficácia da técnica para o controle de *Tuta absoluta* Meyrick, 1917 (Lepidoptera: Gelechiidae) na cultura do tomate na Itália com redução do dano em frutos entre 62-89%. De igual forma, Trona et al. (2009) demonstraram que a implementação de EcoTape FTF (fita adesiva de 500-625m de comprimento que contém dispensadores de feromônio) na confusão sexual da mariposa-das-maçãs, *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Tortricidae), alcança eficácias comparáveis com os de estratégias convencionais baseados em inseticidas

Existe um interesse cada vez maior a nível mundial no desenvolvimento de métodos de controle de pragas ecologicamente mais aceitáveis e sistemas de produção mais sustentáveis. Com o fim de suprir esta necessidade, o uso de semioquímicos e outros produtos naturais possui um papel significativo neste desenvolvimento.<sup>69</sup> No entanto, formulações mais refinadas são necessárias para cada inseto praga, otimização das composições, estabilidade dos semioquímicos no campo e preços acessíveis para o agricultor.<sup>60</sup>

#### 1.6.4. Vantagens do uso de semioquímicos

As vantagens do uso de semioquímicos frente ao controle químico como método de controle são diversas destacando-se a ausência de resíduos tóxicos, além do aumento da atividade dos inimigos naturais, aumento da biodiversidade em ecossistemas agrícolas e especificidade, já que a maior parte destes são bioativos para determinada espécie ou para um grupo restrito de pragas. A desvantagem consiste na baixa persistência uma vez que não fornece um controle a longo prazo, recomendando-se o uso com outras metodologias no MIP.<sup>70</sup> No entanto os feromônios são mais seguros e ambientalmente mais aceitáveis do que os inseticidas convencionais.<sup>61</sup>

#### 1.7. Glândulas produtoras de feromônio

A maioria das glândulas de feromônios são células epidérmicas hipertrofiadas que estão em contato direto com a cutícula da superfície produzida pelas próprias células glandulares. O feromônio é produzido dentro das células, transportado através da cutícula e disseminado a partir da superfície da cutícula. As células podem ser cuboidais, colunares, colunares modificadas ou em caliciformes. As características histológicas dessas células incluem um grande núcleo, muitos vacúolos e, às vezes, uma borda com filamentos; algumas células. Entretanto, diferem muito pouco, histologicamente, das células não modificadas. A cutícula que recobre estas células glandulares é geralmente não coberta. Não há poros grandes na cutícula.<sup>71</sup> A localização das células glandulares pode variar na região do ovipositor, podem estar como uma camada de células localizada na região ventral ou dorsal, com áreas distintas ou ainda essas células podem formar um anel contínuo entre as regiões dorsal e ventral.<sup>71</sup>

Machos de algumas espécies de Lepidoptera têm elaborados órgãos liberadores de feromônio. Diferentes termos descritivos são usados, como androcônias, leques, pelos costais, escovas, pincel de pelos e coremata.<sup>72</sup> O mecanismo de disseminação de feromônio em machos é a modificação das escamas em forma de cabelos, estas escamas modificadas são usualmente compridas e circulares em seção transversal. As células glandulares aparecem como células calciformes aumentadas na base de cada cabelo, com a membrana apical invertida exibindo muitas microvilosidades e cercado uma extensão de endocutícula fibrosa do cabelo. As células têm núcleos lobulados grandes, citoplasma típico de intensa atividade secretória como numerosos vacúolos, complexos de golgi ativos, numerosas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso e liso.<sup>71</sup>

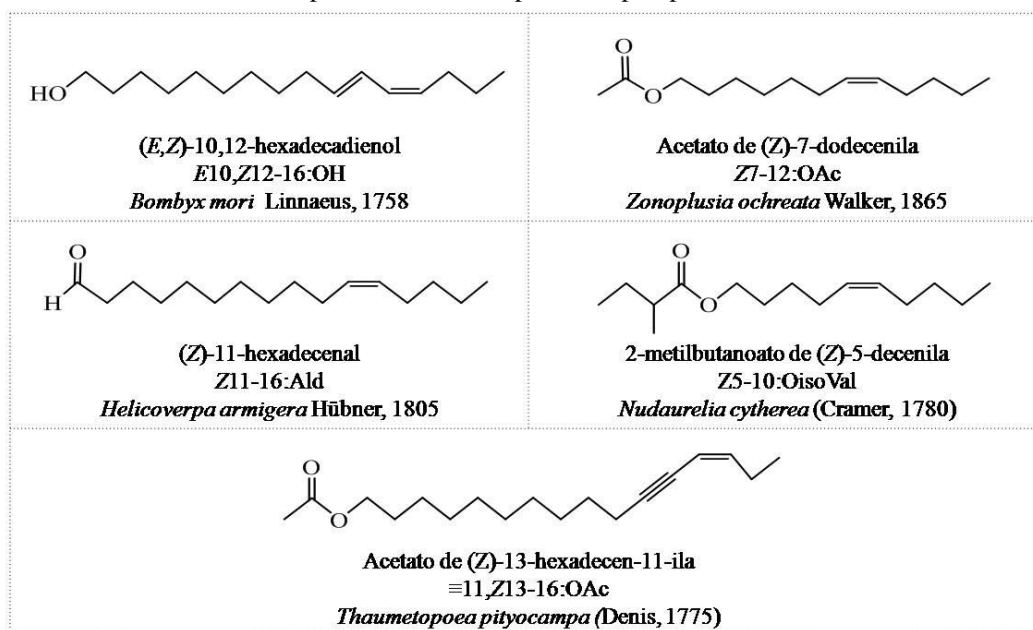
## 1.8. Feromônios sexuais em fêmeas de lepidópteros

A primeira descrição de comunicação sexual baseada em compostos químicos foi demonstrada em mariposas,<sup>73</sup> e o primeiro feromônio sexual foi isolado em 1950 da mariposa *Bombyx mori* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Bombycidae) a partir de cerca de 500.000 fêmeas adultas, sendo sua estrutura publicada apenas em 1959.<sup>53</sup> Os lepidópteros tem-se convertido na ordem de insetos mais estudados em relação aos feromônios, com dados disponíveis para várias centenas de espécies.<sup>74</sup>

As fêmeas de mariposas comumente são responsáveis pela atração sexual, com fins de acasalamento, e produzem feromônios na glândula localizada perto do ovipositor na parte terminal do abdômen.<sup>75</sup> Estes feromônios são caracterizados por sua especificidade para cada espécie, impedindo a hibridização interespecífica.<sup>53</sup>

Os feromônios femininos estão classificados segundo sua estrutura química em feromônios do tipo I constituídos principalmente por compostos de cadeias de carbono entre C<sub>10</sub> e C<sub>18</sub> com álcoois primários e seus derivados, acetatos ou aldeídos, com zero a três insaturações, conforme Figura 8. Adição de grupos funcionais como ésteres de isobutila ou metilbutila e a presença de triplas ligações constituem um novo grupo de feromônios tipo I, também mostrados na Figura 8. Estes feromônios constituem 75% dos conhecidos em fêmeas de lepidópteros.<sup>74</sup>

**Figura 8** - Feromônios femininos representativos do Tipo I em lepidópteros

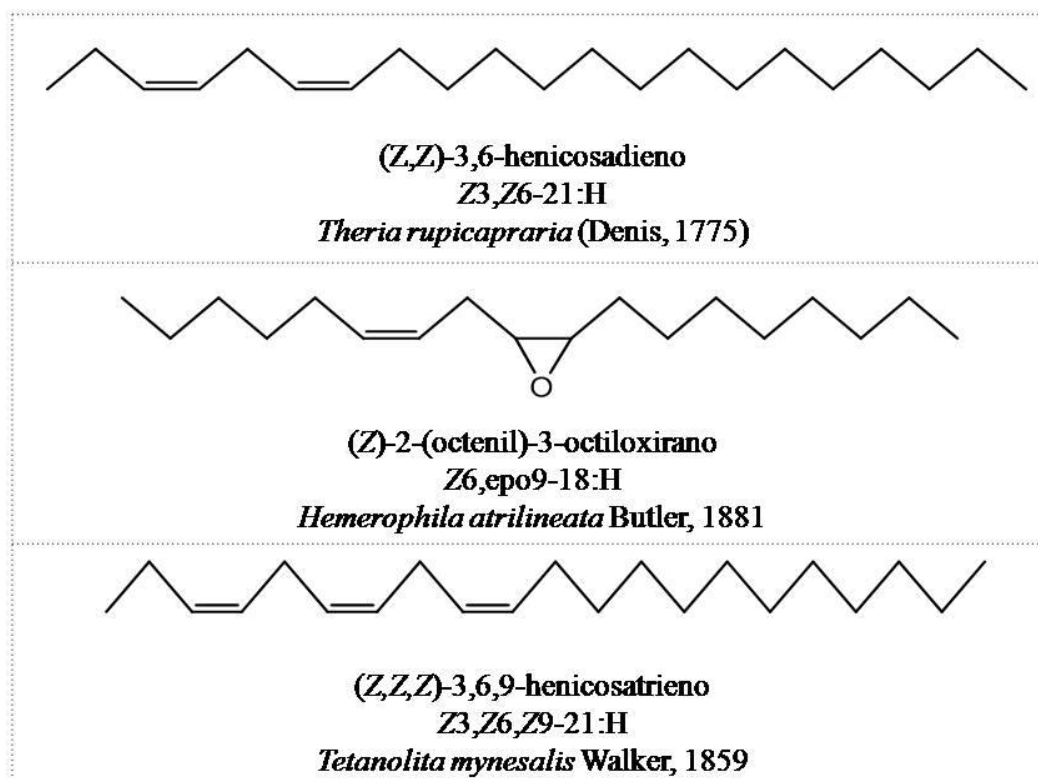


Nota: Estruturas químicas, nomenclatura e abreviação de compostos representativos tipo I. OH: Álcool; Ald: Aldeído; OAc: Acetato; OisoVal: Ester do ácido isovalérico CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>(CH)CH<sub>3</sub>COOR

Os nomes destes feromônios são geralmente abreviados, escrevendo-se primeiro a configuração e a posição da dupla ligação separado por um hífen do número de carbonos da cadeia, seguido por dois pontos e a abreviação do grupo funcional (OAc = acetato, OH = álcool, Ald = aldeído).

Outra grande classe de feromônios sexuais de fêmeas lepidópteros é o Tipo II, que são biossintetizados a partir do ácido linoléico e linolênico, adquiridos durante a alimentação das lagartas. Derivados do tipo Z6,Z9-hidrocarbonetos (derivados do ácido linoléico) e Z3,Z6,Z9-hidrocarbonetos (derivados do ácido linolênico) são caracterizados por cadeias lineares entre 17 e 25 carbonos, uma a cinco duplas ligações com configuração Z separadas por grupos metileno, além da possibilidade de até duas funções epóxido, cetonas produzidas por rearranjos dos epóxidos e grupos funcionais como aldeídos e ésteres,<sup>74;76</sup> como mostrado na Figura 9. As misturas feromonais desta classe apresentam componentes com diferentes comprimentos de cadeia, números de ligações duplas e grupos funcionais, bem como misturas de regioisômeros de epóxidos ou enantiômeros.<sup>77</sup>

**Figura 9** - Feromônios femininos representativos do Tipo II em lepidópteros



Nota: Estruturas químicas, nomenclatura e abreviação de compostos representativos tipo II. H: Hidrocarboneto

Os feromônios de tipo II anteriormente pareciam estar restritos aos macrolepidópteros e, em particular, para as famílias Erebidae e Geometridae.<sup>77</sup> No entanto, estudos recentes na Pyraloidea e Tischerioidea demonstram a presença deste tipo de feromônio também nestas famílias.<sup>76</sup>

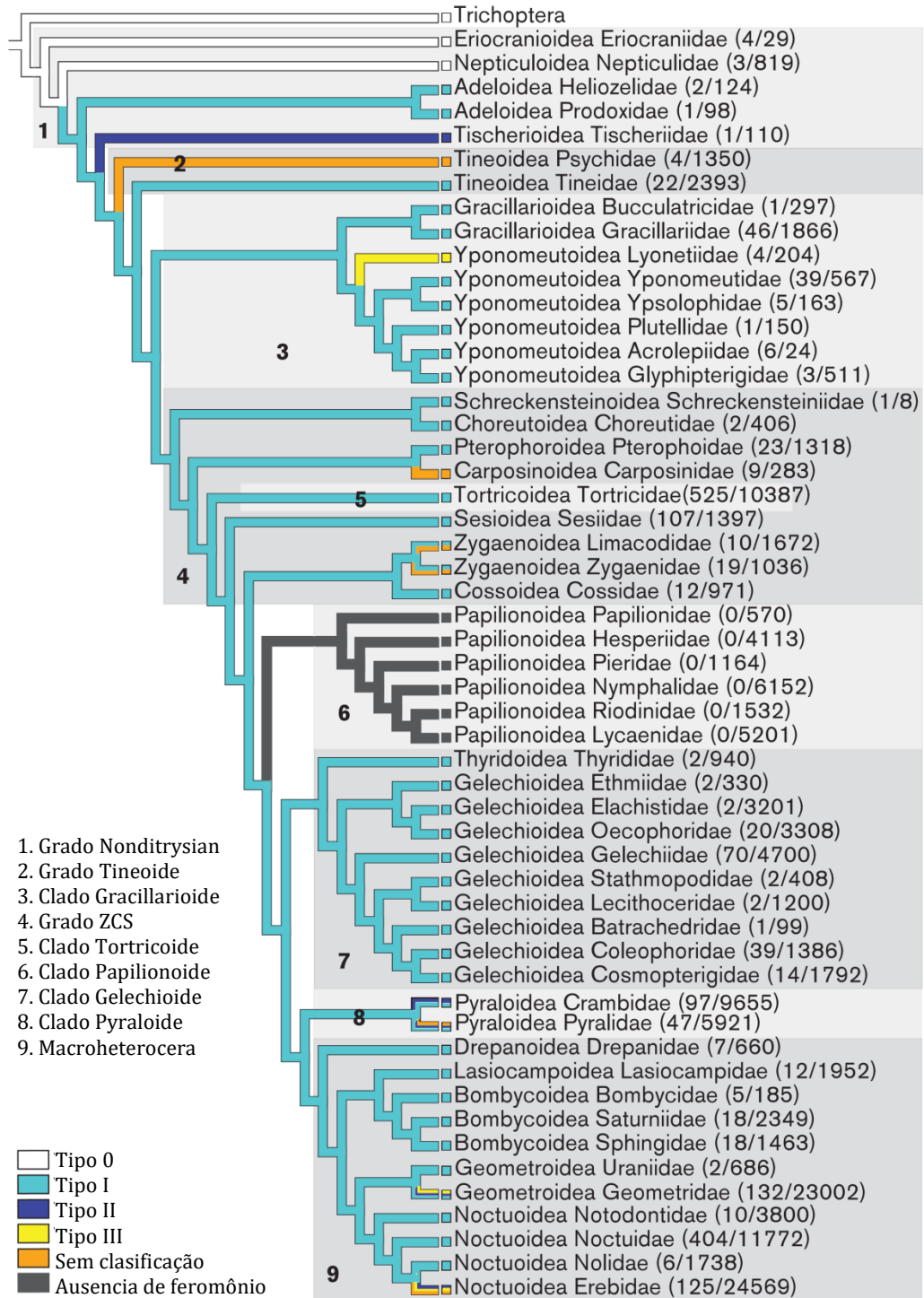
Igualmente aos feromônios tipo I, a nomenclatura das estruturas de tipo II geralmente é abreviada, por exemplo, o (Z,Z,Z)-3,6,9-heptadecatrieno é identificado como Z3,Z6,Z9-17:H. A nomenclatura IUPAC dos epóxidos é mais complexa, o [2R-[2α(2Z,5Z),3α]]-2-(2,5-octadienil)-3-undeciloxirano é abreviado como Z3,Z6,epo9-21:H(9S,10R) e o racemato é identificado como Z3,Z6,epo9-21:H.<sup>74</sup>

Os feromônios tipo 0 presente em linhagens primitivas de lepidópteros consiste em álcoois secundários e cetonas de cadeia curta entre sete e nove átomos de carbono como o sem uma insaturação.<sup>76</sup> Feromônios tipo III são hidrocarbonetos saturados e insaturados, bem como hidrocarbonetos funcionalizados com um ou mais ramificações metílicas. A diferença dos feromônios tipo I e II, o tipo III não é biossintetizado nas glândulas feromonais, se não, aparentemente sintetizados usando como precursor um aminoácido em enócitos e depois transportados através da hemolinfa para a glândula feromonal.<sup>76</sup> Outros feromônios como derivados terpenoides, ésteres propionato de alcoóis secundários, entre outros são pouco comuns e não classificados em nenhum grupo.<sup>76</sup> Uma classificação dos feromônios pela taxonomia (classificação taxonômica do ano 2013) dos lepidópteros pode ser observada na Figura 10.

### 1.9. Feromônios sexuais em machos de lepidópteros

Machos de lepidópteros possuem órgãos liberadores de voláteis conhecidos como androcônias, que estão localizados no abdômen, tórax, pernas e asas, variando desde simples escamas até estruturas complexas. Muitos termos são usados para descrever estes órgãos, tais como escamas androconiais, pelos costais, escovas, pincel de pelos (hairpencil) ou coremata.<sup>72;78-80</sup> Em lepidópteros vários estudos têm identificado a composição destas secreções masculinas em diferentes espécies.<sup>79;81-85</sup> Os machos de algumas espécies de mariposas liberam compostos com similar estrutura as feromônios Tipo I de fêmeas como é o caso de *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae) que apresentam no seu hairpencil álcoois e acetatos lineares entre 14 e 18 átomos de carbono,<sup>86</sup> além de ácidos carboxílicos.<sup>81</sup>

**Figura 10** - Filogenia e feromônio sexual de fêmeas em lepidópteros

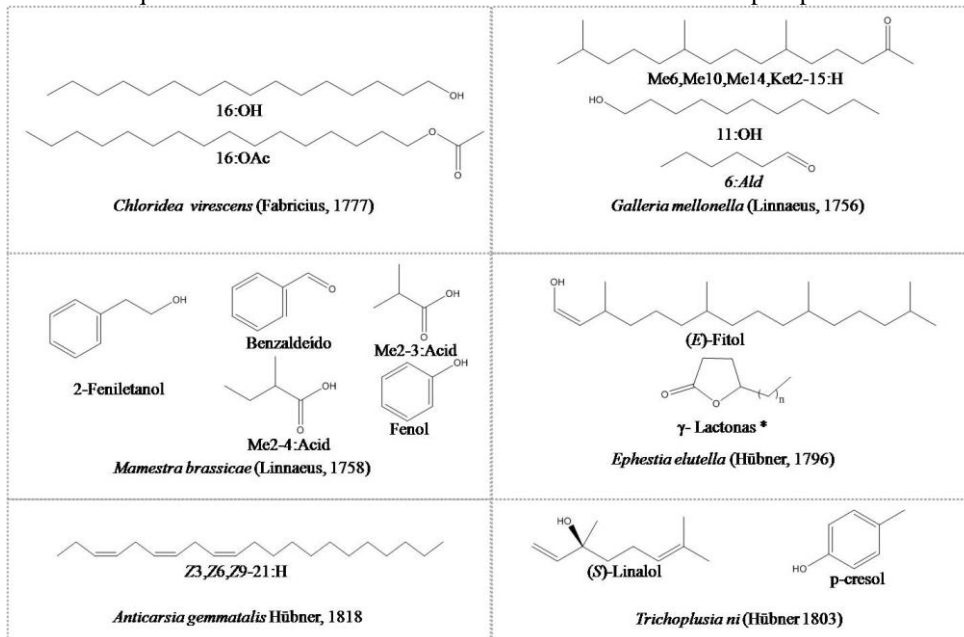


Nota: Números entre parênteses após taxa indicam o número aproximado de feromônios e atraentes relatados, seguido pelo número de espécies em cada táxon.

Fonte: A árvore filogenética é adaptado de Löfstedt et al. 2016.

Lebedeva et al. (2002) identificaram uma série de aldeídos lineares de 6 a 10 átomos de carbonos, undecanol e a cetona 6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona como componentes das glândulas feromonais em asas de machos de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1756) (Lepidoptera: Pyralidae). Outras espécies podem apresentar compostos completamente diferentes aos encontrados em fêmeas, conforme Figura 11. *Mamestra brassicae* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Noctuidae) apresenta benzaldeído, ácido 2-metilpropanoico, ácido 2-metilbutanoico, fenol e 2-feniletanol como componentes de seu hairpencil<sup>87</sup> e *Pseudaletia unipuncta* Haworth, 1809 (Lepidoptera: Noctuidae) tem como componentes do hairpencil ácido acético, benzaldeído e fenol.<sup>78</sup> Os feromônios liberados pelos machos podem ser sintetizados através das mesmas rotas biosintéticas que usam as fêmeas como acontece com os feromônios tipo I, através das rotas biosintéticas de ácidos graxos<sup>88</sup> ou também podem ser compostos adquiridos nas plantas hospedes destes insetos, por exemplo, os machos das borboletas e mariposas pertencentes às Danainae, Ithomiinae e Arctiidae usam os alcalóides pirrolizidínicos das plantas hospedes para a produção do feromônio masculino.<sup>89</sup>

**Figura 11** - Estruturas químicas e nomenclatura de feromônios masculinos em lepidópteros



Os compostos feromonais de machos tem sido identificados cumprindo várias funções biológicas. Durante o cortejo, machos de muitas espécies de mariposas liberam feromônios que funcionam como afrodisíacos para fêmeas coespecíficas.<sup>79;90</sup> Hillier e Vickers (2011) demonstraram que voláteis liberados por “hairpencil” de *Helicoverpa subflexa* (Guenée, 1852) (Lepidoptera: Noctuidae) aumentam a probabilidade de sucesso de acasalamento com as fêmeas da mesma espécie. Estes afrodisíacos permitem que as fêmeas entrem em repouso e fiquem mais propensas a aceitar o cortejo do macho, indicando a seleção sexual das fêmeas.<sup>87</sup>



Também foi observado que o (*S*)-(+)-linalool, *p*-cresol, e *m*-cresol compostos em hairpencil de machos de *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803) (Lepidoptera: Noctuidae) atraem as fêmeas em túnel de vento.<sup>79</sup>

Em *Ephestia elutella* (Hübner, 1796) (Lepidoptera: Pyralidae) observou-se que os compostos (*E*)-fitol e uma série de  $\gamma$ -lactonas saturadas das glândulas feromonais das asas atraem machos coespecíficos,<sup>91</sup> enquanto que em *Grapholita molesta* Busck, 1916 (Lepidoptera: Tortricidae) além dos machos serem atraídos por voláteis de hairpencil de machos da mesma espécie, estes tentam copular com fêmeas que estão sendo ativamente cortejadas por outros machos.<sup>92</sup>

Os compostos produzidos pelos machos de cada espécie também podem inibir o acasalamento entre espécies através dos efeitos sobre o sexo masculino ou sobre as fêmeas. Esses feromônios, conhecidos como antiafrodisíacos<sup>93</sup> são transferidos durante o acasalamento e tornam as fêmeas acasaladas repelentes aos machos subsequentes<sup>94-96</sup> deste modo conferem uma vantagem seletiva direta ao macho doador, reduzindo a competição espermática. Assim, em machos, estes voláteis atuam como repelentes coespecíficos de machos, para inibir a competição sexual,<sup>90</sup> como acontece em machos de *H. virescens*, que tentaram copular com menor frequência na presença de extrato de hairpencil da mesma espécie<sup>80</sup> e, no caso das fêmeas, permitem a estas diferenciar entre machos de outras espécies pelos seus componentes voláteis, indicando que a presença seletiva por espécie destes compostos é indispensável para o sucesso do acasalamento. Ensaios com *H. virescens* e *H. subflexa* demonstram que o acasalamento entre uma fêmea de *H. virescens* e um macho de *H. subflexa* ou entre uma fêmea *H. subflexa* e um macho de *H. virescens* tiveram maior êxito na presença do extrato dos hairpencil de machos da mesma espécie. Também observaram que os machos de *H. virescens* com ablação de hairpencil melhorou o acasalamento com fêmeas de *H. subflexa*.<sup>80</sup>

Igualmente às misturas feromonais das fêmeas, a relação específica entre os componentes dos feromônios masculinos é requerida para a aceitação do macho pela fêmea, permitindo diferenciar entre seus pretendentes ou entre machos de diferentes espécies com os mesmos componentes feromonais.<sup>86</sup>

#### **1.10. Feromônios sexuais de Castniidae**

Estudos em procura do feromônio sexual tem sido conduzidos unicamente nas espécies *Pasandisia archon* (Burmeister, 1880) que causa sérios danos em palmas

principalmente no mediterrâneo Europeu,<sup>97</sup> *Eupalamides cyparissias* (Fabricius, 1776) presente em culturas de palmas em toda a região da Amazônia<sup>98;99</sup> e *Telchin licus* (Drury, 1773), espécie de estudo neste trabalho de tese.

Sarto et al. (2012) investigaram a presença de feromônios em extratos hexânicos obtidos da cabeça, tórax, asas e abdômen de ambos os sexos e dos ovipositores das fêmeas, de *P. archon*. No estudo identificaram ácidos graxos, álcoois e aldeídos. O ácido (Z)-11-hexadecenoico, ácido palmítico e ácido oleico foram identificados nos extratos das asas e tórax dos machos e ovipositores das fêmeas, e apresentaram atividade eletrofisiológica. No entanto os autores consideram que a presença dos ácidos graxos em ambos os sexos, e a sua ausência em coletas de voláteis da mesma espécie exclui qualquer função na comunicação química.

Os compostos *Z,E*-farnesal, *E,E*-farnesal e (*E,Z*)-2,13-octadecadienol, presentes tanto nos voláteis coletados quanto nas extrações com hexano das asas dos machos foram compostos ativos em antenas de fêmeas e considerados como feromônio de curto alcance masculino em *P. archon*.<sup>100</sup> O (*E,Z*)-2,13-octadecadienol foi reiteradamente identificado como feromônio masculino da *P. archon*, entretanto identificado em androcônias presentes no segundo par de pernas dos machos.<sup>101</sup> Um recente estudo identificou a presença de acetato de octadecanila, acetato de (*Z*)-9-octadecenila e acetato de (*E,Z*)-2,13-octadecadienila na glândula da terminália masculina.<sup>102</sup>

Na mariposa *E. cyparissias* os compostos geraniol geraniol, octacosano e  $\beta$ -sitosterol presente nos extratos de asas posteriores dos machos elicitaram resposta eletroantegráfica em antenas de fêmeas.<sup>103</sup> Estes estudos com *P. archon* e *E. cyparissias* sugerem que a comunicação química em Castniidae, talvez, esteja governada pelos voláteis liberados por machos e não por fêmeas como ocorre em borboletas. Entretanto, esforços são feitos na tentativa de identificar o feromônio feminino, característico em mariposas.

Riolo et al. (2014) identificou 24 compostos nos extratos dos ovipositores de fêmeas de *P. archon* com 24 horas de vida. Entretanto, nenhum desses compostos foram eletroantegráficamente ativos em ambos os sexos.

Rebouças et al. (1999) analisaram extratos hexânicos de ovipositores de *T. licus* e identificaram hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos insaturados e saturados, álcoois insaturados e aldeídos. Estes extratos quando testados em bioensaios apresentaram atratividade para os machos.

### 1.11. Feromônios sexuais da subfamília Herminiinae (Lepidoptera: Erebidae)

Dentro de Herminiinae reportam-se 1000 espécies com distribuição latitudinal tropical temperadas, alimentando-se de folhas e fungos.<sup>106</sup> Espécies como a “dark-spotted palthis moth” *Palthis angulalis* Hübner, 1796 é encontrada no oeste de Newfoundland, na zona costeira de British Columbia, e ao sul da Flórida e Texas, e a *Idia aemula* Hübner, 1813 encontra-se no sul de Canadá, Flórida e Texas e na maior parte da Eurásia.<sup>106</sup>

A subfamília Herminiinae era anteriormente classificada no grupo Quadrifinae dos Noctuides, reconhecidos porque a maioria das espécies é atraída para feromônios do tipo II ou outros que não são classificados dentro dos tipos I ou II. A maioria dos relatos refere-se a compostos que atraem os machos e alguns poucos à identificação do feromônio sexual da fêmea.<sup>77;107</sup>

No norte da Flórida, Landolt et al. (1996) em ensaios de campo atraíram com o epóxido Z3,epo6,Z9-19:H (6S,7R) a Herminiinae *Renia salusalis* Walker, 1859. De igual forma, foram testados no Vietnã feromônios de tipo II, Z3,Z6,epo9-21:H, Z3,Z6,epo9-18:H, Z3,Z6,epo9-19:H e Z3,epo6,Z9-19:H encontrando dentre os machos atraídos, três espécies pertencentes à família Erebidae, *Hypena* sp. atraído por Z3,Z6,epo9-21:H; *Luceria* sp. atraído por Z3,Z6,epo9-18:H; e *Zanclognatha* sp. por Z3,epo6,Z9-19:H.<sup>109</sup> Esta última espécie pertence à subfamília Herminiinae, gênero que anteriormente foi reportado sendo atraído pelo isômero E do feromônio sexual de *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Lymantriidae) (Me2,epo7-18:H).<sup>110</sup> Similarmente as espécies *Bleptina caradrinalis* Guenée, 1852 e *Idia aemula* foram atraídas à iscas com misturas dos epóxidos de Z3,Z6,Z9-21:H (epo6; epo3; epo9), enquanto que *Idia americalis* (Guenée, 1854) foi atraída para mistura de epóxidos de Z3,Z6,Z9-20:H.<sup>111</sup>

Em 1996, Haynes et al. demonstraram que o enantiômero atraente de machos da Herminiinae *Tetanolita mynesalis* Walker, 1859 é o Z3,epo6,Z9-21:H (6S,7R), em uma mistura 1:1 com Z3,Z6,Z9-21:H e que são usados como alomônios pelas aranhas boleadeiras para atrair machos de mariposas noturnas. Esta é a única espécie que tem sido descrita usando o hidrocarboneto trieno como parte da mistura feromônica feminina.

Em Tokyo, Ando et al. (1995;1993) observaram que machos de *Adrapsa notigera* (Butler, 1879) são atraídos à iscas pelos epóxidos Z3,epo6,Z9-23:H e Z3,epo6,Z9-22:H, enquanto que de *Paracolax pryeri* (Butler, 1879) são atraídos por Z3,epo6,Z9-20:H.

A maioria dos machos da subfamília Herminiinae são atraídos por compostos de cadeias de 19 a 23 carbonos com duas insaturações e epóxidos *cis* principalmente na posição 6, além de apenas um composto químico ser responsável pela atração na maioria das espécies.<sup>113</sup> A estereoespecificidade do epóxido em alguns casos pode ser de extrema importância, já que Millar et al.,(1991a) notaram que o enantiômero Z9,epo6-19:H (6R,7S) é antagonista ao atraente sexual Z9,epo6-19:H (6S,7R) de *Plathis angulalis* Hübner, 1796.

### 1.12. Feromônios sexuais da subfamília Phycitinae (Lepidoptera: Pyralidae)

Aproximadamente 5900 espécies de mariposas descritas em todo o mundo fazem parte da família Pyralidae e cerca de 4000 destas pertencem à subfamília Phycitinae.<sup>17</sup> No entanto, pouco mais que 30 feromônios sexuais de fêmeas e 10 atraentes de machos têm sido relatados.<sup>116</sup> Os feromônios sexuais nesta subfamília são geralmente Tipo I, incluindo acetatos, álcoois e aldeídos monoinsaturados ou di-insaturados com cadeias de 12 a 16 carbonos.<sup>76</sup>

Especies como a “traça-da-farinha”, *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879, “beehive honey moth”, *Vitula edmandsii serratilineella* (Ragonot, 1887), “Tobacco moth”, *Ephestia elutella* (Hübner, 1796), e *H. grandella* usam o (Z,E)-9,12-tetradecadienol junto com o respectivo aldeído ou acetato como mistura feromonal.<sup>117-121</sup> Também, junto com estes componentes, é observado a presença de acetatos monoinsaturados como o acetato de (Z)-9-tetradecenila e acetato de (Z)-11-hexadecenila, presentes nos feromônios da “traça-indiana-da-farinha” *Plodia interpunctella* (Hübner, 1813) e na “traça-do-cacau” *Cadra cautella* (Walker, 1863).<sup>120;122-124</sup>

Além das insaturações nas posições 9 e 12 da cadeia do composto feromonal, tem-se observado insaturações na posição 11 e 13, como na mistura feromonal de componentes monoinsaturados de *Etiella zinckenella* (Treitschke, 1832), composta por acetato de (Z)-9-tetradecenila, acetato de (Z)-11-tetradecenila e acetato de (E)-9-dodecenila<sup>125</sup> e na “locust bean moth”, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller, 1839), na qual o feromônio está composto por (Z,E,Δ)-9,11,13-tetradecatrienal, (Z,E)-9,11-tetradecadienal e (Z)-9-tetradecenal.<sup>126</sup>

Por outro lado, alguns estudos têm identificado misturas feromonais consistindo de componentes Tipo I e Tipo II. Por exemplo, a mistura feromonal da “navel orangeworm”, *Amyelois transitella* (Walker, 1863), identificada como (Z,Z)-11,13-hexadecadienal, (Z,Z)-11,10-hexadecadienol e (Z,Z,Z,Z,Z)-3,6,9,12,15-tricosapentaeno,<sup>127;128</sup> além da mistura dos

componentes (Z,Z,Z,Z,Z)-3,6,9,12,15-pentacosapentaeno e acetato de (Z,E)-9,11-tetradecadienila presente em várias espécies do gênero *Dioryctria*.<sup>129-131</sup>

### 1.13. Sensilas em lepidópteros

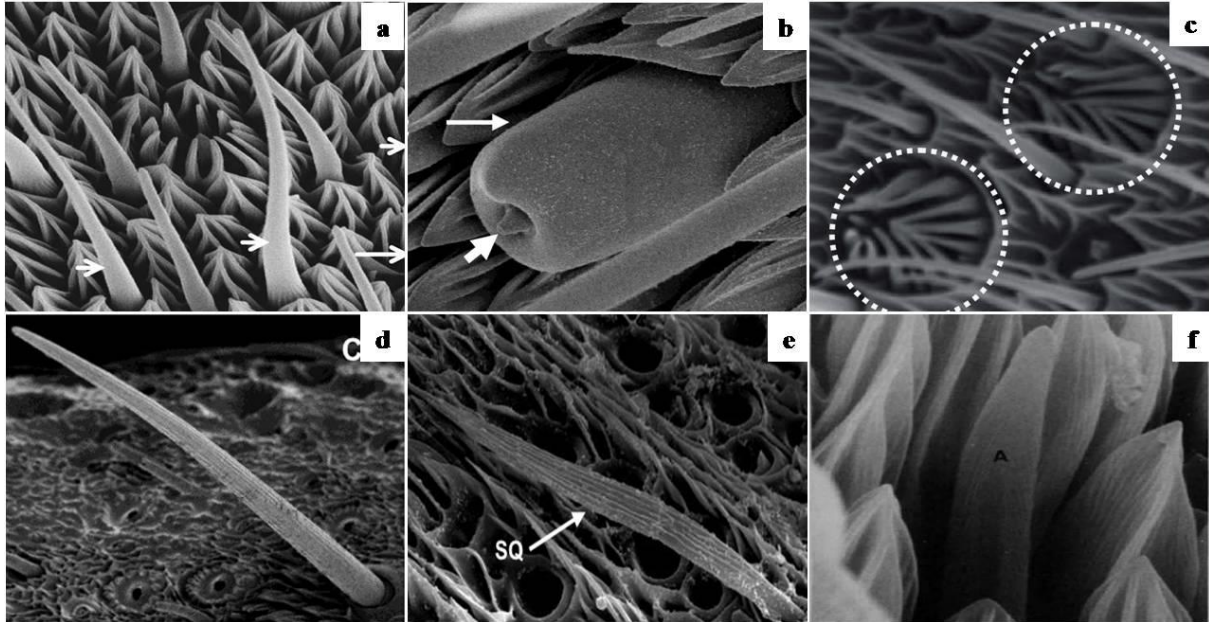
Antenas de mariposas desempenham papéis importantes na procura de hospedeiros, alimentos, reconhecimento de parceiro e escolha do local de oviposição.<sup>132</sup> Elas variam amplamente entre espécies em termos do seu comprimento, o tamanho global e os tamanhos dos segmentos individuais, sendo que a segmentação e a presença de estruturas características estão intimamente relacionadas com as suas funções ecológicas.<sup>133;134</sup> As antenas são tradutoras de sinais, nas quais estímulos externos são traduzidos em impulsos nervosos para o cérebro do inseto. Esta transformação ocorre em órgãos presentes nas antenas conhecidos como sensilas. Os compostos químicos como os feromônios entram na linfa sensilar através de poros presentes na cutícula e são transportados por proteínas ligantes de odores (OBPs) até os receptores olfativos situados no dendrito das sensilas, em que a ativação dos receptores (por as moléculas dos feromônios ou por conformações ativas das OBPs) inicia uma cascata de eventos que leva à geração de impulsos nervosos.<sup>135;136</sup>

As antenas de mariposas têm uma superfície dorsal que se constitui principalmente de escamas e uma superfície ventral constituída por sensilas.<sup>137</sup> Os insetos adultos possuem diferentes tipos de sensilas, cada uma com funções específicas e que desempenham papéis importantes em vários comportamentos durante a vida adulta.<sup>138</sup> Estas sensilas são as principais ferramentas de comunicação química dos insetos e oferecem muitas vantagens funcionais na capacidade de um inseto de perceber e responder aos sinais ambientais, facilitando a detecção de estímulos sensoriais.<sup>139</sup> A complexidade e abundância de sensilas nas antenas das mariposas estão ligadas intimamente com a ecologia comportamental do inseto.<sup>140</sup>

Existem várias classes de sensilas e, dentre as mais reportadas, encontram-se as sensilas tricóides (Figura 12a) importante para detecção de sinais olfativos principalmente feromônios sexuais; sensila estilocônica (Figura 12b) e coelocônica (Figura 12c) sensíveis à temperatura e umidade; sensilas caéticas (Figura 12d), campaniformes e esquamiformes (Figura 12e) envolvidas nos estímulos mecânicos; sensilas caéticas também reportadas como sensíveis a estímulos gustativos e as sensilas aurículas (Figura 12f) são descritas como sensíveis aos voláteis de plantas em *B. mori*. As sensilas coelocônicas também foram sensíveis a voláteis de plantas.<sup>141-144</sup>

Os receptores de feromônios em mariposas usualmente estão ao longo das sensilas tricóides. Estas são geralmente multiporosas, o que permite o acesso dos componentes feromonais aos neurônios da mariposa.<sup>144-146</sup>

**Figura 12** - Sensilas de antenas de mariposas



Nota: (a) Sensila tricóide de *Spodoptera littoralis*. (b) Sensila estilocônica de *Catocala remissa*. (c) Sensila coelocônica de *Helicoverpa armigera*. (d) Sensila caética de *C. remissa*. (e) Sensila esquamiforme de *C. remissa*. (f) Sensila auricífica *Pseudaletia Unipuncta*.

Fonte: Lavoiedornik & Mcneil (1987); Binyameen et al. (2012); Diongue et al. (2013); Zheng et al. (2014) .

## 2. REFERÊNCIAS

1. NATIONAL SUPPLY COMPANY. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, quarto levantamento.** (CONAB). Brasília, Brazil: CONAB, Companhia-Nacional-de-Abastecimento: p. 77. 2018. "Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cana> >. Acesso em: 05 July 2017.
2. GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S. et al. Pragas das plantas e seu controle. FEALQ (Ed.). In: **Entomologia agrícola**. Piracicaba, Brazil: FEALQ, 2002. v. 10, p. 450.
3. LONG, W. H.; HENSLEY, S. D. Insect pests of sugar cane. **Annu Rev Entomol**, v. 17, p. 149-76, 1972.
4. LESLIE, G. Pests of Sugarcane. James G (Ed.). In: **Sugarcane**: Blackwell Publishing Ltd, 2007 p. 78-100.
5. CENTRO-DE-TECNOLOGIA-CANAVIEIRA. **Pragas e doenças da cana-de-açúcar "roguing"**. Brasil; 2013. p 55.
6. GUAGLIUMI, P. **Pragas da cana-de-açúcar: Nordeste do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto do Açúcar e do Alcool; 1972.
7. GONZÁLES, J. Castniinae (Lepidoptera: Castniidae) from Venezuela. III: Genera represented by only one known species. **Ciencia**, v. 7, n. 3, 1999.
8. GONZÁLEZ, J. M.; COCK, M. J. A synopsis of the Castniidae (Lepidoptera) of Trinidad and Tobago. **Zootaxa**, v. 762, p. 1-19, 2004.

9. RÍOS, S. D.; GONZÁLEZ, J. M. A synopsis of the Castniidae (Lepidoptera) of Paraguay. **Zootaxa**, n. 3055, p. 43-61, 2011.
10. SALAZAR, J. A.; RODRÍGUEZ, G.; RODRÍGUEZ, C. Datos adicionales sobre Castnidos colombianos (Lepidoptera: Castniidae) **Boletín del museo entomológico francisco luís gallego**, v. 5, n. 2, p. 17, 2013.
11. COSTA, L. A. Um novo inimigo da cana: a broca *Castnia licus* (Drury) descoberta em Pernambuco. **Chácaras e Quintais**, v. 37, n. 4, p. 377-8, 1928.
12. ALMEIDA, L. C.; DIAS FILHO, M. M.; ARRIGONI, E. D. B. Primeira ocorrência de *Telchin licus* (Drury, 1773), a broga gigante da cana-de-açúcar, no estado de são paulo. **Brazilian journal of agriculture**, v. 82, n. 2, p. 223-6, 2015.
13. SILVA JUNIOR, M. P. D.; NICOLA, M. V.; ROSSI, M. M. Broca gigante da cana-de-açúcar, *Telchin licus licus* (Drury, 1773) na região centro-sul: preocupação para os produtores. **Nucleus**, p. 49-54, 2008.
14. CARVALHO, M. M.; DE FREITAS BUENO, R. C. O.; CARVALHO, L. C. et al. Importância econômica e generalidades para o controle de *Telchin licus* Drury, 1773 (Lepidoptera: Castniidae) em cana-de-açúcar **Enciclopédia Biosfera**, p. 1623-37, 2013.
15. REGIER, J. C.; MITTER, C.; ZWICK, A. et al. A large-scale, higher-level, molecular phylogenetic study of the insect order lepidoptera (moths and butterflies). **PloS one**, v. 8, n. 3, 2013.
16. HEIKKILÄ, M.; MUTANEN, M.; WAHLBERG, N. et al. *Elusive ditrysiian* phylogeny: an account of combining systematized morphology with molecular data (Lepidoptera). **BMC Evolutionary Biology**, v. 15, n. 1, p. 260, 2015.
17. ERIK J. VAN NIEUKERKEN; LAURI KAILA; IAN J. KITCHING et al. Order Lepidoptera Linnaeus, 1758. Zhang Z-Q (Ed.). In: **Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness**: Zootaxa 2011. v. 3148, p. 212–21.
18. LAMAS, G. Bibliografía de los Castniidae (Lepidoptera) americanos. **Revista Peruana de Entomología**, v. 35, p. 13-23, 1993.
19. GONZÁLEZ, J.; STÜNNING, D. The Castniinae at the zoologisches forschungsmuseum Alexander Koenig, bonn (Lepidoptera: Castniidae). **Entomologische zeitschrift**, v. 117, n. 2, p. 89-93, 2007.
20. JUNIOR, A. S. N.; BALDANI, J. I.; SÁ, M. F. G. D. et al. **Manejo da Broca-Gigante da Cana-de-Açúcar (*Telchin licus*) (Drury) (Lepidoptera: Castniidae) no Nordeste do Brasil**. Aracaju - Brazil; 2015.
21. MENDONÇA, A.; VIVEIROS, A.; SAMPAIO, F. A broca gigante da cana-de-açúcar, *Castnia licus* Drury, 1770 (Lep.: Castniidae). MENDONÇA AF (Ed.). In: **Pragas da cana-de-açúcar**. Maceió: Insetos & Cia, 1996 p. 131-67.
22. BOTELHO, P.; GARCIA, J.; MACEDO, L. Outras lagartas que atacam a cana-de-açúcar. In: **Controle de pragas da cana de açúcar, Biocontrol, Sertãozinho** 2006 p. 25-8.
23. MINISTERIO DA AGRICULTURA, P. E. A. AGROFIT Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. 2018. "Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 17 jun 2018.

24. BARBOSA, T. J. A.; MICHELETTI, S. M. F. B.; SOUZA, L. A. D. et al. Utilização de inseticida a base de fipronil no controle de *Telchin licus licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae), em laboratório. In: Congresso brasileiro de entomologia, 22 Uberlândia. Anais. 2008.
25. FIGUEIRÊDO, M. D. F. D. S.; MARQUES, E. J.; LIMA, R. O. R. D. et al. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Contra a broca gigante da cana-de-açúcar *Castnia licus* (Drury) (Lepidoptera: Castniidae). **Neotropical Entomology**, v. 31, p. 397-403, 2002.
26. CRAVEIRO, K. I. C.; JÚNIOR, J. E. G.; SILVA, M. C. M. et al. Variant CryIIa toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer. **Journal of Biotechnology**, v. 145, n. 3, p. 215-21, 2010.
27. SCHAUS, W. **Descriptions of new South American moths**. United States National museum smithsonian institution Washington: US Government Printing Office; 1906.
28. POOLE, R. W. Noctuidae. Part 3. Heppner JB (Ed.). In: **Lepidopterorum Catalogus (New Series)**. New York: Backhuys Publishers, 1989. v. 118, p. 1015-314.
29. ZAHIRI, R.; HOLLOWAY, J. D.; KITCHING, I. J. et al. Molecular phylogenetics of Erebiidae (Lepidoptera: Noctuoidea). **Syst Entomol**, v. 37, n. 1, p. 102-24, 2012.
30. GUAGLIUMI, P. Situação das cigarrinhas e das brocas nos canaviais do estado de Santa Catarina e descobrimento de uma nova praga da cana [*Saccharum spp*, Brasil]. **Brasil Acucareiro**, v. 81, n. 3, p. 10-3, 1973.
31. REPSOLD, C. A.; PEIXOTO, S. M. A cultura da cana-de-açúcar. In: **Programa de capacitação para agricultura irrigada no norte fluminense**. Campos-RJ: SERSE, M. D. I. e DNOS-IICA, 1984. v. 39, p. 62.
32. MACEDO, D. **Broca-peluda *Hyponeuma taltula***. Maracaju, MG 2005.
33. MACEDO, D.; MACEDO, N. Aspectos da biologia de *Hyponeuma taltula* (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. In: Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açúcareiros e Alcooleiros do Brasil. Maceió-AL, BrazilQ Gráfica March - April 2007, 2007. p. 44-6.
34. MORAES, G. C.; ÁVILA, C. J. **Insetos-praga associados ao solo na cultura da cana-de-açúcar, no Estado de Mato Grosso do Sul**. Dourados, MS; 2014. p 37.
35. DARIO, G. J. A.; DARIO, I. S. N.; VALLE, F. N. D. et al. Ocorrência das brocas gigante (*Castia licus drury*) e peluda (*Hyponeuma taltula schaus*, 1904) em canaviais do nordeste e o controle com o inseticida tiametoxam + clorantraniliprole. In: XXV Congresso Brasileiro de Entomologia. Campo Verde. Resumo. 2014.
36. GARCIA, J. F. **Manual de identificação de pragas da Cana**. São Paulo, Brazil: p. 220. 2013. "Disponível em: < [https://www.fmcagricola.com.br/portal/manuais/pragas\\_cana/](https://www.fmcagricola.com.br/portal/manuais/pragas_cana/) >. Acesso em: 30 Dez 2018.
37. CANAOESTE. **Pragas da cana**. São Paulo, 2013. "Disponível em: < <http://www.canaoeste.com.br/conteudo/pragas-na-cana> >. Acesso em: 16 jun. 2018.
38. ZENKER, M. M.; LIMA, I. S.; SPECHT, A. et al. Caracterização morfológica dos imaturos de *Hyponeuma taltula* (Schaus) (Lepidoptera: Noctuidae: Herminiinae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 4, p. 1101-7, 2007.



39. RODRIGUES, A. D.; PINTO, A. D. S.; SEGATO, S. V. Controle químico e biológico da broca-peluda, *Hyponeuma* sp. (Lepidoptera: Noctuidae), na cana-de-açúcar **Nucleus**, v. 9, n. 1, p. 283-90, 2012.
40. SOBERON-CHAVEZ, M.; BRAVO-DE LA PARRA, A.; GOMEZ-GOMEZ, I. Mutant *Bacillus thuringiensis* cry genes and methods of use. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. patent 9,090,906. 2015 28 jul. 2015.
41. FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. C.; SAMPAIO, P. D. T. B. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* DC): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta Amazônica (Brasil)**, v. 32, n. 4, p. 647-61, 2002.
42. PINTO, A. A. Avaliação de danos causados por insetos em sementes de Andiroba [(*Carapa guianensis* Aubl.) e Andirobinha (*C. procera* DC.) (Meliaceae)] na Reserva Florestal Adolpho Ducke em Manaus, AM, Brasil. 2007.
43. FLOYD, R. B.; HAUXWELL, C.; GRIFFITHS, M. et al. Taxonomy, Ecology, and Control of *Hypsipyla* Shoot Borers of Meliaceae. Lugo AE; Figueroa Colón JC, Alayón M (Ed.). In: **Big-Leaf Mahogany: Genetics, Ecology, and Management**. New York, NY: Springer New York, 2003 p. 381-94.
44. SILVA, M. C. A.; ROSA, L. D.; VIEIRA, T. A. The efficiency of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) as natural barrier to attack by *Hypsipyla grandella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) on the *Brazilian mahogany* (*Swietenia macrophylla* King). **Acta Amazonica**, v. 43, n. 1, p. 19-24, 2013.
45. HILJE, L.; MORA, G. A. Promissory botanical repellents/deterrents for managing two key tropical insect pests, the whitefly *Bemisia tabaci* and the mahogany shootborer *Hypsipyla grandella*. **Advances in Phytomedicine**, v. 3, p. 379-403, 2006.
46. GOULET, E.; RUEDA, A.; SHELTON, A. Management of the mahogany shoot borer, *Hypsipyla grandella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), through weed management and insecticidal sprays in 1- and 2-year-old *Swietenia humilis* Zucc. plantations. **Crop Protection**, v. 24, n. 9, p. 821-8, 2005.
47. JESUS-BARROS, C. R. D.; LIRA-GUEDES, A. C.; GUEDES, M. C. et al. Registro da ocorrência de *Hypsipyla ferrealis* e *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) em frutos de andirobeiras (*Carapa guianensis*, Meliaceae) em Macapá - AP, Brasil. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 3, p. 765-9, 2015.
48. RANYSE B. QUERINO; HÉLIO TONINI; ALBERTO L. MARSARO JÚNIOR et al. Predação de Sementes de Andiroba (*Carapa spp.*) por *Hypsipyla ferrealis* Hampson (Lepidoptera: Pyralidae) em Roraima. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa Roraima**, v. 05, p. 19, 2008.
49. JESUS-BARROS, C. R. D.; LIRA-GUEDES, A. C.; GUEDES, M. C. et al. Perdas na produção de sementes de andiroba ocasionadas pela Broca-da-Andiroba (*Hypsipyla spp.*) (Lepidoptera: Pyralidae) no Sul do Estado do Amapá. **Comunicado Técnico 133 Embrapa Amapá**, v. 1, p. 4, 2014.
50. BECKER, V. O. Observaciones sobre la biología de *H. ferrealis* (Hampson), una especie afin en Estudios sobre el barrenador *Hypsipyla grandella* (Zeller) Lepidoptera, Pyralidae. **CATIE**, v. 2, n. 101, p. 154-61, 1976.
51. POWELL, J. A. Lepidoptera: Moths, Butterflies. Cardé VHRT (Ed.). In: **Encyclopedia of Insects** San Diego: Academic Press, 2009 p. 559-87.

52. WITZGALL, P.; KIRSCH, P.; CORK, A. Sex pheromones and their impact on pest management. **J Chem Ecol**, v. 36, n. 1, p. 80-100, 2010.
53. SHANI, A. Chemical communication agents (pheromones) in integrated pest management. **Drug Dev Res**, v. 50, n. 3-4, p. 400-5, 2000.
54. VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. Introdução aossemioquímicos e terminologia. HOLOS (Ed.). In: **Feromônios de insetos, biologia, química e emprego no manejo de pragas**. Ribeirão Preto 2001 p. 9-12.
55. ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, p. 722-31, 2009.
56. TREMATERRA, P. Aspects related to decision support tools and Integrated Pest Management in food chains. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 733-42, 2013.
57. JYOTHI, K. N.; PRASUNA, A. L.; PRASAD, A. R. et al. Development of indigenous pheromone technology for monitoring of spotted bollworm, *Earias vittella* Fab (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton. **J Agri Tech**, v. 10, n. 1, p. 197-207, 2014.
58. DIAZ-GOMEZ, O.; MALO, E. A.; PATIÑO-ARRELLANO, S. A. et al. Pheromone trap for monitoring *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae) activity in cruciferous crops in Mexico. **Fla Entomol**, v. 95, n. 3, p. 602-9, 2012.
59. MERRILL, S. C.; WALTER, S. M.; PEAIRS, F. B. et al. Spatial variability of western bean cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) pheromone trap captures in sprinkler irrigated corn in eastern Colorado **Environ Entomol**, v. 40, n. 3, p. 654-60, 2011.
60. GUERRERO, A.; MALO, E. A.; COLL, J. et al. Semiochemical and natural product-based approaches to control *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: Noctuidae). **J Pest Sci**, v. 87, n. 2, p. 231-47, 2014.
61. TREMATERRA, P. Advances in the use of pheromones for stored-product protection. **J Pest Sci**, v. 85, n. 3, p. 285-99, 2012.
62. TREMATERRA, P.; GENTILE, P. Five years of mass trapping of *Ephestia kuehniella* Zeller: a component of IPM in a flour mill. **J Appl Entomol**, v. 134, n. 2, p. 149-56, 2010.
63. NAVARRO, D. M. A. F.; MURTA, M. M.; DUARTE, A. G. et al. Aspectos práticos relacionados ao uso do Rincoforol, o feromônio de agregação da Broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) no controle de pragas do coqueiro: análise de sua eficiência em campo. **Química Nova**, v. 25, p. 32-6, 2002.
64. MONTES, D. A. N. **Manejo Integrado de Plagas**. El Salvador: University of Kentucky College of Agriculture; 2000. p 20.
65. PEASE, G.; STORM, C. G. Efficacy of pheromone-based control system, Exosex<sup>TM</sup> SPTab, against moth pests in European food processing facilities. In: 10th international working conference on stored-product protection. Proceedings Estoril, 2010. p. 183-9.
66. GU, P.; PENG, C. L.; LI, J. et al. Optimization and field evaluation of the sex pheromone of *Trichophysetis cretacea* (Lepidoptera: Crambidae) for pest monitoring. **J Appl Entomol**, v. 137, n. 6, p. 462-8, 2013.
67. COCCO, A.; DELIPERI, S.; DELRIO, G. Control of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouse tomato crops using the mating disruption technique. **J Appl Entomol**, v. 137, n. 1-2, p. 16-28, 2012.

68. TRONA, F.; ANFORA, G.; BALDESSARI, M. et al. Mating disruption of codling moth with a continuous adhesive tape carrying high densities of pheromone dispensers. **B Insectol**, v. 62, n. 1, p. 7-13, 2009.
69. NI, X. Z.; LEI, Z. R.; HE, K. L. et al. Integrated pest management is the lucrative bridge connecting the ever emerging knowledge islands of genetics and ecology PREFACE. **Insect Sci**, v. 21, n. 5, p. 537-40, 2014.
70. RODRÍGUEZ, L. C.; NIEMEYER, H. M. Integrated pest management, semiochemicals and microbial pest-control agents in Latin American agriculture. **Crop Prot**, v. 24, n. 7, p. 615-23, 2005.
71. PERCY-CUNNINGHAM, J. E.; MACDONALD, J. A. Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing glands Prestwich GD, Blomquist GJ (Ed.). In: **Pheromone biochemistry**. London: Academic Press, 1987 p. 27-75.
72. BIRCH, M. C.; POPPY, G. M.; BAKER, T. C. Scents and eversible scent structures of male moths. **Annu Rev Entomol**, v. 35, p. 25-58, 1990.
73. GREENFIELD, M. D. Moth sex pheromones: an evolutionary perspective. **Fla Entomol**, p. 4-17, 1981.
74. ANDO, T.; INOMATA, S.; YAMAMOTO, M. Lepidopteran sex pheromones. Schulz S (Ed.). In: **The chemistry of pheromones and other semiochemicals I Top Curr Chem**. Berlin: Springer, 2004. v. 239, p. 51-96.
75. CHAPMAN, R. F. **The Insects Structure and Function**. 4 ed. New York: Cambridge University Press; 2009. p 959.
76. LÖFSTEDT, C.; WAHLBERG, N.; MILLAR, J. Evolutionary patterns of pheromone diversity in Lepidoptera. Allison JD, Cardé RT (Ed.). In: **Pheromone communication in moths: evolution, behavior and application**. California: University of California Press, 2016 p. 43-78.
77. MILLAR, J. G. Polyene hydrocarbons and epoxides: A second major class of lepidopteran sex attractant pheromones. **Annu Rev Entomol**, v. 45, p. 575-604, 2000.
78. FITZPATRICK, S. M.; MCNEIL, J. N.; MILLER, D. Age-specific titer and antennal perception of acetic-acid, a component of male *Pseudaletia unipuncta* (Haw) (Lepidoptera: Noctuidae) hairpencil secretion **J Chem Ecol**, v. 15, n. 2, p. 641-8, 1989.
79. HEATH, R. R.; LANDOLT, P. J.; DUEBEN, B. D. et al. Identification of male cabbage-looper sex-pheromone attractive to females. **J Chem Ecol**, v. 18, n. 3, p. 441-53, 1992.
80. HILLIER, N. K.; VICKERS, N. J. Hairpencil volatiles influence interspecific courtship and mating between two related moth species. **J Chem Ecol**, v. 37, n. 10, p. 1127-36, 2011.
81. TEAL, P. E. A.; TUMLINSON, J. H. Isolation, identification, and biosynthesis of compounds produced by male hairpencil glands of *Heliothis-Virescens* (F) (Lepidoptera: Noctuidae) **J Chem Ecol**, v. 15, n. 1, p. 413-27, 1989.
82. LECOMTE, C.; THIBOUT, E.; PIERRE, D. et al. Transfer, perception, and activity of male pheromone of *Acrolepiopsis assectella* with special reference to conspecific male sexual inhibition. **J Chem Ecol**, v. 24, n. 4, p. 655-71, 1998.
83. LEBEDEVA, K.; VENDILO, N.; PONOMAREV, V. et al. Identification of pheromone of the greater wax moth *Galleria mellonella* from the different regions of Russia. **IOBC-WPRS Bulletin**, v. 259, p. 229-31, 2002.

84. HERNANDEZ, R., J. L.; BOFILL, R.; DAPPORTO, L. et al. Morphological and chemical analysis of male scent organs in the butterfly genus *Pyrgus* (Lepidoptera: Hesperidae). **Org Divers Evol**, v. 14, n. 3, p. 269-78, 2014.
85. JYOTHI, K. N.; PRASUNA, A. L.; PRASAD, A. R. Evidence for presence of female produced pheromone components in male scent brush extract of castor semi-looper moth *Achaea janata* L. **Indian journal of experimental biology**, v. 43, n. 4, p. 335-41, 2005.
86. HILLIER, N. K.; VICKERS, N. J. The role of heliothine hairpencil compounds in female *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) behavior and mate acceptance. **Chem Senses**, v. 29, n. 6, p. 499-511, 2004.
87. JACQUIN, E.; NAGNAN, P.; FREROT, B. Identification of hairpencil secretion from male *Mamestra brassicae* (L) (Lepidoptera: Noctuidae) and electroantennogram studies. **J Chem Ecol**, v. 17, n. 1, p. 239-46, 1991.
88. JURENKA, R. Insect pheromone biosynthesis. **Top Curr Chem**, v. 239, p. 97-131, 2004.
89. SCHULZ, S. Insect-plant interactions – metabolism of plant compounds to pheromones and allomones by lepidoptera and leaf beetle. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 1998, n. 1, p. 13-20, 1998.
90. HILLIER, N. K.; KELLY, D.; VICKERS, N. J. A specific male olfactory sensillum detects behaviorally antagonistic hairpencil odorants. **J Insect Sci**, v. 7, 2007.
91. PHELAN, P. L.; SILK, P. J.; NORTHCOTT, C. J. et al. Chemical identification and behavioral characterization of male wing pheromone of *Ephestia elutella* (Pyrilidae). **J Chem Ecol**, v. 12, n. 1, p. 135-46, 1986.
92. BAKER, T. C.; CARDE, R. T. Courtship behavior of the Oriental Fruit Moth (*Grapholitha molesta*) (Lepidoptera: Tortricidae) - Experimental-analysis and consideration of the role of sexual selection in the evolution of courtship pheromones in the lepidoptera. **Ann Entomol Soc Am**, v. 72, n. 1, p. 173-88, 1979.
93. HAPP, G. M. Multiple sex pheromones of the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* L. **Nature**, v. 222, n. 5189, p. 180, 1969.
94. SCHULZ, S.; YILDIZHAN, S.; STRITZKE, K. et al. Macrolides from the scent glands of the tropical butterflies *Heliconius cydno* and *Heliconius pacheus*. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 5, n. 21, p. 3434-41, 2007.
95. GILBERT, L. E. Postmating female odor in *Heliconius* butterflies: a male-contributed antiaphrodisiac? **Science**, v. 193, n. 4251, p. 419-20, 1976.
96. ANDERSSON, J.; BORG-KARLSON, A.-K.; WIKLUND, C. Sexual cooperation and conflict in butterflies: a male-transferred anti-aphrodisiac reduces harassment of recently mated females. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1450, p. 1271-5, 2000.
97. SARTO, I. M. V.; AGUILAR, L. The Castniid palm borer, *Paysandisia archon* (Burmeister, 1880), in Europe: comparative biology, pest status and possible control methods (Lepidoptera: Castniidae). **Nachr Entomol Ver Apollo**, v. 26, n. 1, p. 61-94, 2005.
98. VASQUEZ, J.; DELGADO, C.; COUTURIER, G. et al. Pest insects of the palm tree *Mauritia flexuosa* Lf, dwarf form, in Peruvian Amazonia. **Fruits**, v. 63, n. 04, p. 227-38, 2008.

99. RIBEIRO, R. C.; LEMOS, W. D. P.; CASTRO, A. A. D. et al. *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae): A potential biological control agent of lepidopteran pests of oil palm in the Brazilian amazon. **Florida Entomologist**, v. 96, n. 2, p. 676-8, 2013.
100. SARTO, I. M. V.; ACIN, P.; ROSELL, G. et al. Moths behaving like butterflies. Evolutionary loss of long range attractant pheromones in castniid moths: a *Paysandisia archon* model. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e29282, 2012.
101. FRÉROT, B.; DELLE-VEDOVE, R.; BEAUDOIN-OLLIVIER, L. et al. Fragrant legs in *Paysandisia archon* males (Lepidoptera: Castniidae). **Chemoecology**, v. 23, n. 3, p. 137-42, 2013.
102. QUERO, C.; I MONTEYS, V. S.; ROSELL, G. et al. Sexual communication in castniid moths: Males mark their territories and appear to bear all chemical burden. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0171166, 2017.
103. COSTA, D. D. L. **Estudo químico e morfológico da broca-da-coroa-foliar *Eupalamides cyparissias* (Fabricius, 1776) (Lepidoptera: Castniidae) de areáceas.** 2015. 145 f. PhD - Universidade Federal de Alagoas, Maceió.
104. RIOLO, P.; VERDOLINI, E.; ANFORA, G. et al. Perching mate-locating strategy in *Paysandisia archon* (Lepidoptera: Castniidae): behavioral and morpho-physiological investigations. **J Econ Entomol**, v. 107, n. 3, p. 1009-21, 2014.
105. REBOUÇAS, L. M. C.; CARACIOLO, M. D. S. B.; SANT'ANA, A. E. G. et al. Composição química da glândula abdominal da fêmea da mariposa *Castnia licus* (Drury) (Lepidoptera: Castniidae): possíveis feromônios e precursores. **Quim Nova**, v. 22, p. 645-8, 1999.
106. MITCHELL, A.; MITTER, C.; REGIER, J. C. Systematics and evolution of the cutworm moths (Lepidoptera: Noctuidae): evidence from two protein-coding nuclear genes. **Syst Entomol**, v. 31, n. 1, p. 21-46, 2006.
107. ANDO, T.; OHSAWA, H.; UENO, T. et al. Hydrocarbons with ahomoconjugated polyene system and their monoepoxy derivatives - sex attractants of geometrid and noctuid moths distributed in Japan. **J Chem Ecol**, v. 19, n. 4, p. 787-98, 1993.
108. LANDOLT, P. J.; TOTH, M.; FRANCKE, W. et al. Attraction of moths (Lepidoptera: Arctiidae, Geometridae, Noctuidae) to enantiomers of several epoxydienes. **Fla Entomol**, v. 79, n. 3, p. 392-7, 1996.
109. VAN HAI, T.; VAN VANG, L.; SON, P. K. et al. Sex attractants for moths of Vietnam: Field attraction by synthetic lures baited with known lepidopteran pheromones. **J Chem Ecol**, v. 28, n. 7, p. 1473-81, 2002.
110. MINYAILO, V. A.; KOVALEV, B. G.; KIROV, E. I. et al. On the attractiveness of disparlure, the sex pheromone of the gypsy moth *Porthetria dispar* (Lepidoptera: Orgyidae) for males of *Zanclognatha lunaris* (Lepidoptera: Noctuidae). **Zoologicheskii Zhurnal**, v. 56, n. 2, p. 309-10, 1977.
111. WONG, J. W.; UNDERHILL, E. W.; MACKENZIE, S. L. et al. Sex attractants for geometrid and noctuid moths - field trapping and electroantennographic responses to triene hydrocarbons and monoepoxydiene derivatives **J Chem Ecol**, v. 11, n. 6, p. 727-56, 1985.
112. HAYNES, K. F.; YEARGAN, K. V.; MILLAR, J. G. et al. Identification of sex pheromone of *Tetanolita mynesalis* (Lepidoptera: Noctuidae), a prey species of bolas spider, *Mastophora hutchinsoni*. **J Chem Ecol**, v. 22, n. 1, p. 75-89, 1996.

113. ANDO, T.; KISHI, H.; AKASHIO, N. et al. Sex attractants of geometrid and noctuid moths - chemical characterization and field-test of monoepoxides of 6,9-dienes and related-compounds. **J Chem Ecol**, v. 21, n. 3, p. 299-311, 1995.
114. MILLAR, J. G.; GIBLIN, M.; BARTON, D. et al. Chiral lepidopteran sex attractants - blends of optically-active c20 and c21 diene epoxides as sex attractants for geometrid and noctuid moths **Environ Entomol**, v. 20, n. 2, p. 450-7, 1991.
115. MILLAR, J. G.; GIBLIN, M.; BARTON, D. et al. Synthesis and field screening of chiral monounsaturated epoxides as lepidopteran sex attractants and sex-pheromone components **J Chem Ecol**, v. 17, n. 5, p. 911-29, 1991.
116. ANDO, T. Pheromone List for Lepidopterous. 2014. "Disponível em: < <http://www.tuat.ac.jp/~antetsu/LepiPheroList.htm> >. Acesso em: 23 Feb 2019.
117. KUWAHARA, Y.; HARA, H.; ISHII, S. et al. The sex pheromone of the Mediterranean flour moth. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 447-8, 1971.
118. STRUBLE, D.; RICHARDS, K. Identification of sex pheromone components of the female driedfruit moth, *Vitula edmandsae serratilineella*, and a blend for attraction of male moths. **J Chem Ecol**, v. 9, n. 6, p. 785-801, 1983.
119. KRASNOFF, S. B.; VICK, K. W.; COFFELT, J. A. (Z,E)-9,12-Tetradecadien-1-ol: A component of the sex pheromone of *Ephestia elutella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). **Environ Entomol**, v. 13, n. 3, p. 765-7, 1984.
120. KUWAHARA, Y.; CASIDA, J. E. Quantitative analysis of the sex pheromone of several phycitid moths by electron-capture gas chromatography. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 681-4, 1973.
121. BLASSIOLI-MORAES, M. C.; BORGES, M.; LAUMANN, R. A. et al. Identification and field evaluation of a new blend of the sex pheromone of *Hypsipyla grandella*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, p. 977-86, 2017.
122. ZHU, J.; RYNE, C.; UNELIUS, C. R. et al. Reidentification of the female sex pheromone of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*: evidence for a four component pheromone blend. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 92, n. 2, p. 137-46, 1999.
123. ALLISON, J. D.; CARDÉ, R. T. Heritable variation in the sex pheromone of the almond moth, *Cadra cautella*. **J Chem Ecol**, v. 32, n. 3, p. 621-41, 2006.
124. READ, J.; HAINES, C. Secondary pheromone components and synergism in stored-products phycitinae. **J Chem Ecol**, v. 5, n. 2, p. 251-7, 1979.
125. TABATA, J.; YOKOSUKA, T.; HATTORI, M. et al. Sex attractant pheromone of the limabean pod borer, *Etiella zinckenella* (Treitschke) (Lepidoptera: Pyralidae), in Japan. **Appl Entomol Zool**, v. 43, n. 3, p. 351-8, 2008.
126. BAKER, T. C.; FRANCKE, W.; MILLAR, J. G. et al. Identification and bioassay of sex pheromone components of carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller). **J Chem Ecol**, v. 17, n. 10, p. 1973-88, 1991.
127. KUENEN, L. P. S.; MCELFRISH, J. S.; MILLAR, J. G. Identification of critical secondary components of the sex pheromone of the navel orangeworm (Lepidoptera: Pyralidae). **J Econ Entomol**, v. 103, n. 2, p. 314-30, 2010.

128. LEAL, W. S.; PARRA-PEDRAZZOLI, A. L.; KAISSLING, K. E. et al. Unusual pheromone chemistry in the navel orangeworm: novel sex attractants and a behavioral antagonist. **Naturwissenschaften**, v. 92, n. 3, p. 139-46, 2005.
129. MILLAR, J. G.; GRANT, G. G.; MCELFFRESH, J. S. et al. (3Z, 6Z, 9Z, 12Z, 15Z)-Pentacosapentaene, a key pheromone component of the fir coneworm moth, *Dioryctria abietivorella*. **J Chem Ecol**, v. 31, n. 5, p. 1229-34, 2005.
130. LÖFSTEDT, C.; SVENSSON, G. P.; JIRLE, E. V. et al. (3Z,6Z,9Z,12Z,15Z)-pentacosapentaene and (9Z,11E)-tetradecadienyl acetate: sex pheromone of the spruce coneworm *Dioryctria abietella* (Lepidoptera: Pyralidae). **J Appl Entomol**, v. 136, n. 1-2, p. 70-8, 2012.
131. HALL, D. R.; FARMAN, D.; DOMÍNGUEZ, J. C. et al. Female Sex Pheromone of the Cone Moth, *Dioryctria mendacella*: Investigation of Synergism between Type I and Type II Pheromone Components. **Journal of chemical ecology**, v. 43, n. 5, p. 433, 2017.
132. HANSSON, B. Olfaction in lepidoptera. **Experientia**, v. 51, n. 11, p. 1003-27, 1995.
133. KEIL, T. A. Comparative morphogenesis of sensilla: a review. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 26, n. 3-4, p. 151-60, 1997.
134. ZHENG, H.; LIU, H.; GUO, S. et al. Scanning electron microscopy study of the antennal sensilla of *Catocala remissa*. **B Insectol**, v. 67, n. 1, p. 63-71, 2014.
135. LEAL, W. S. Pheromone reception. Schulz S (Ed.). In: **The chemistry of pheromones and other semiochemicals II Top Curr Chem**. Berlin: Springer, 2004. v. 240, p. 1-36.
136. LAUGHLIN, J. D.; HA TS FAU - JONES, D. N. M.; JONES DN FAU - SMITH, D. P. et al. Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein. **Cell**, v. 133, n. 7, p. 1255-65, 2008.
137. MALO, E. A.; CASTREJON-GOMEZ, V. R.; CRUZ-LOPEZ, L. et al. Antennal sensilla and electrophysiological response of male and female *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) to conspecific sex pheromone and plant odors. **Ann Entomol Soc Am**, v. 97, n. 6, p. 1273-84, 2004.
138. KEIL, T. A. Functional morphology of insect mechanoreceptors. **Microsc Res Tech**, v. 39, n. 6, p. 506-31, 1997.
139. DERBY, C. D.; STEULLET, P. Why do animals have so many receptors? The role of multiple chemosensors in animal perception. **The Biological bulletin**, v. 200, n. 2, p. 211-5, 2001.
140. FAUCHEUX, M. J. Antennal sensilla of male *Lophocorona pediasia* Common 1973 and their phylogenetic implications (Lepidoptera: Lophocoronidae). **Ann Soc Entomol Fr**, v. 42, n. 1, p. 113-8, 2006.
141. SCHNEIDER, D. Insect antennae. **Annu Rev Entomol**, v. 9, n. 1, p. 103-22, 1964.
142. POPHOF, B. Olfactory responses recorded from sensilla coeloconica of the silkworm *Bombyx mori*. **Physiol Entomol**, v. 22, n. 3, p. 239-48, 1997.
143. ANDERSON, P.; HALLBERG, E.; SUBCHEV, M. Morphology of antennal sensilla auricillica and their detection of plant volatiles in the Herald moth, *Scoliopteryx libatrix* L. (Lepidoptera: Noctuidae). **Arthropod Struct Dev**, v. 29, n. 1, p. 33-41, 2000.

144. ZHANG, S.; MAIDA, R.; STEINBRECHT, R. A. Immunolocalization of odorant-binding proteins in noctuid moths (Insecta, Lepidoptera). **Chem Senses**, v. 26, n. 7, p. 885-96, 2001.
145. LEI, H.; CHRISTENSEN, T. A.; HILDEBRAND, J. G. Local inhibition modulates odor-evoked synchronization of glomerulus-specific output neurons. **Nature neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 557, 2002.
146. VÁSQUEZ, G. M.; SYED, Z.; ESTES, P. A. et al. Specificity of the receptor for the major sex pheromone component in *Heliothis virescens*. **J Insect Sci**, v. 13, 2013.
147. LAVOIEDORNIK, J.; MCNEIL, J. N. Sensilla of the antennal flagellum in *Pseudaletia Unipuncta* (Haw) (Lepidoptera, Noctuidae). **Int J Insect Morphol**, v. 16, n. 2, p. 153-67, 1987.
148. BINYAMEEN, M.; ANDERSON, P.; IGNELL, R. et al. Spatial organization of antennal olfactory sensory neurons in the female *Spodoptera littoralis* moth: differences in sensitivity and temporal characteristics. **Chem Senses**, v. 37, n. 7, p. 613-29, 2012.
149. DIONGUE, A.; YANG, J. T.; LAI, P. Y. Biomorphometric characteristics of different types of sensilla detected on the antenna of *Helicoverpa armigera* by scanning electron microscopy. **J Asia-Pac Entomol**, v. 16, n. 1, p. 23-8, 2013.



## CAPÍTULO I

### **I. Evidence of chemical communication in *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae): A morpho- and electrophysiological investigation**

Merybeth F. Triana<sup>1¶\*</sup>, Paulo H. B. França<sup>1&</sup>, Abel F. Queroz<sup>1&</sup>, Jakeline M dos Santos<sup>1&</sup>  
Henrique F. Goulart<sup>2&</sup>, Antônio E. G. Santana<sup>2¶\*</sup>

<sup>1</sup> Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil

<sup>2</sup> Agricultural Science Center, Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil

\*Corresponding authors:

E-mail: aegsal@gmail.com (AEGS)

E-mail: merybeth.triana@iqb.ufal.br (MFT)

¶These authors contributed equally to this work.

&These authors also contributed equally to this work

## 1. ABSTRACT

The giant sugarcane borer *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae) is a day-flying moth pest of sugarcane, pineapples and bananas. To contribute to the understanding of chemical communication in this species, we report the morphology of its olfactory system and study the chemical composition of its body extracts scent-producing organs. The ventral surface of the clubbed antennae of *T. licus* has six morphological types of sensilla: sensilla trichoid, basiconic, chaetic, squamiform, choeloconic, and auricillica. The telescopic ovipositor shows no evidence of a sexual gland, and no female-specific compound has been identified. On the other hand, the mid-leg basitarsus of males releases (*E,Z*)-2,13-octadecadienol and (*Z,E*)-2,13-octadecadienol, which are electroantennographically active in both sexes. These compounds are known female sex pheromones in the Sesiidae family and male pheromones in the Castniidae family. Thus, we suggest that they serve as short-range pheromones in *T. licus*, although further investigations are necessary to elucidate the biological implications of these compounds in an ecological context.

## 2. INTRODUCTION

The giant sugarcane borer *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae) is distributed throughout Central and South America [1-6]. Its larvae feed on the stems and rhizomes of sugarcane, pineapples and bananas [7,8], and mainly causing severe agricultural issues in sugarcane crops [6,9]. Castniidae occur in the Neotropical region, Southeast Asia and Australia. The species present in Asia and Australia are commonly known as "sun moths", while species that reside in the Neotropical regions are often referred to as "butterfly moths" [10,11]. These denominations came from the habit of day-flying activity and usually exhibit features that resemble butterflies such as clubbed antenna, apposition eyes, colored broad wings and slender bodies [12-14].

Currently, Castniidae are part of the Sesioidea superfamily, forming a clade related to the Sesiidae and Brachodidae families [15,16]. However, there are discordant debates about the close relationship between Sesiidae and Castniidae, so the systematic position of the Castniidae family is not clearly resolved [17].

The reproductive behavior of Lepidoptera is largely related to the diurnal or nocturnal habits of these individuals. Chemical communication in moths during mating usually consists of the release of long-range sex pheromones by females to attract conspecific males. Males, in turn, when close enough to the female, release short-range pheromones that act as an

aphrodisiac to facilitate copulation [18,19]. Day-flying butterflies, on the other hand, make extensive use of visual cues to attract the opposite sex, while males release short-range pheromones within the reach of females [20-22].

It has been claimed that moths from the Castniidae family also utilize visual and chemical signals similarly to butterflies [13,14,23]. Previous studies reported that females of *Paysandisia archon* (Burmeister, 1880) (Lepidoptera: Castniidae) have apparently lost the sex gland responsible for the production of long-range sex pheromone in an evolutionary context [13,22,24], and in addition, releasing structures have been identified in males of *P. archon* [25-27].

Few investigations aimed at elucidation of the underlying chemical communication in *T. licus* have been carried out so far. Rebouças et al. (1999) speculated about the existence of a putative pheromone released by female ovipositors, since hexane extracts elicited male responses in bioassays. However, ethological studies have postulated that visual and chemical cues are needed for mating in *T. licus* [23].

This investigation aims to contribute to the understanding of chemical communication in the Castniidae family through characterization of the sensilla in the antennae and scent-producing organs in *T. licus*. In addition to the identification of sex-specific electrophysiologically active compounds from female and male specimens.

### **3. MATERIALS AND METHODS**

#### **3.1. Insect collection and maintenance**

Larvae and pupae of *T. licus* were collected during the 2015-2019 period from infested sugarcane crops at the Triunfo Agroindustrial Mill, located in Boca da Mata (9°38'27.6"S, 36°13'12"W), and at the Santo Antônio Mill, located in São Luís do Quitunde (9°19'5.7"S, 35°33'39.2"W), which are both in the state of Alagoas, Brazil. The larvae were individualized in Petri dishes and fed with sugar cane until reaching the pupal stage, at which point they were separated males and females [29] and further placed in trays containing sugarcane straw inside cages of dimensions of 2 m x 1 m x 0.6 m, and these cages were maintained at room temperature ( $27.2 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ ,  $81 \pm 3\%$  RH). The adults were fed with a 10% honey solution.

### 3.2. Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy images were used to characterize and account for the antennal sensilla, as well as to make observations of the male legs of *T. licus*. The antennae and legs were removed from one- to two-day-old males and females previously cold anesthetized (-20°C). Immediately after removal, the legs were immersed in a 2% glutaraldehyde in phosphate buffer solution (0.1 M, pH 7) for 5 min, then dehydrated in a gradient series of ethanol (50%, 70%, 80% and 90%, 10 min each). They were metallized with gold at 10 mA during 8 min. Antennae and tarsi were observed using a scanning electron microscope (Shimadzu SSX-550 Superscan) at 12 kV. The differences between the sizes of the antennal sensilla and between males and females were analyzed using an independent sample *t* test ( $p < 0.05$ ) in R Software (v. 3.4.1).

### 3.3. Light microscopy

We used light microscopy to study the anatomy and histology of the ovipositor ( $N = 4$ ), in particular focusing on the intersegmental membrane between the 8th and 9th abdominal segments, in which the pheromone gland is usually located in moths. After females were cold anesthetized, the ovipositor was extracted and fixed with Bouin's solution over 24 hours at room temperature, followed by dehydration in a gradient ethanol series. The organs were incorporated into paraffin wax using xylene as a transition solvent, and 5  $\mu\text{m}$  sections were obtained using a microtome (Leica RM2125 RTS). Finally, the slices were mounted on glass slides, hydrated and stained with hematoxylin-eosin to be observed under a light microscope (Olympus BX41). Digital images were recorded using a high-resolution digital camera (Olympus DP25).

### 3.4. Compound extraction

Extracts of the thorax, abdomen, wings, legs, and genitalia were obtained from three 1- to 2-day-old virgin adults for each sex. Each organ was separated from the body of the previously cold anesthetized insects and immersed in hexane for 30 min. The volume used for each extract was adapted to cover the entire sample (2 mL for thorax, abdomen, wings extracts and 200-500  $\mu\text{L}$  for the other extracts). The extracts were then purified by filtration on a silica gel column and concentrated with a nitrogen flow to 200  $\mu\text{L}$ .

### 3.5. Electroantennogram recordings

Electroantennographic (EAG) responses of antennae from 1- to 2-day-old males and females were investigated with the body extracts, using hexane as negative control. Then, 10

$\mu\text{L}$  of each treatment was placed on a strip of filter paper inside a glass pipette, and EAG recordings were obtained from one insect for each treatment. The magnitude of the antennal response was measured using Syntech EAGPro 2.0.2 (Syntech, Netherlands), and the air flux was generated with a Syntech CS-55 controller with a 0.5 s pulse duration. Comparison between the treatments and control was conducted using a Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ) in R Software (v. 3.4.1).

### 3.6. Chromatographic analyzes

Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) was used for structural elucidation of the compounds present in the extracts. A gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (Shimadzu QP2010 Ultra) equipped with an Rtx-5 column (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ , Restek®) was used under the following chromatographic conditions: 50°C (5 min hold), thereafter heating at 15°C/min until reaching 220°C, followed by heating at 4°C/min to 250°C (20 min hold). Then, 1  $\mu\text{L}$  of each extract was injected in splitless mode at 250°C, with helium as the carrier gas (1.5 mL/min). The mass spectrometer was operated with electron impact ionization (70 eV) in scan mode between 35 to 500  $m/z$ . The ion source remained constant at 200°C and the interface at 250°C. The identification of compounds was performed by comparing each mass spectrum and Kovats index with authentic standards and/or by comparison with the NIST08, NIST08s and WILEY229 databases.

The mid-leg extracts sectioned into the femur, tibia, basitarsus, tarsus and claw ( $N = 3$ ) were analyzed by gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) in a chromatograph (GC-2010 Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an Rtx-5 column (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ , Restek®). The oven was programmed from 100°C to 250°C at 15°C/min (5 min hold). Then, 1  $\mu\text{L}$  of the standard solution was injected in splitless mode at 250°C, using hydrogen as the carrier gas, with a flow of 1.0 mL/min. The mixture of (*E,Z*)-2,13-octadecadienol (E2,Z13-18:OH) and (*Z,E*)-2,13-octadecadienol (Z2,E13-18:OH) in the legs and hindwings extracts was quantified using a calibration curve of (E2,Z13-18:OH). Mid-leg extracts as well as E2,Z13-18:OH and Z2,E13-18:OH solutions (200  $\mu\text{g/mL}$ ) were analyzed in an Rtx-Wax column (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$  Restek®). The oven was programmed from 120°C to 240°C at 8°C/min (5 min hold). Then, 1  $\mu\text{L}$  of the standard solution was injected in splitless mode at 240°C, using hydrogen as the carrier gas, with a flow of 1.0 mL/min.

An extract of mid-legs was derivatized at 40°C overnight in a mixture of dimethyl disulfide (DMDS) (50 $\mu\text{L}$ ) and a THF solution of iodine (60 mg/mL, 5  $\mu\text{L}$ ). The DMDS

adducts obtained were analyzed by GC-MS using the abovementioned chromatographic parameters.

Gas chromatography coupled to electroantennography (GC-EAD) was used to analyze the electrophysiological activity of body extracts and synthetic Z2,E13-18:OH and E2,Z13-18:OH solutions (200 µg/mL for standards) against those antennae from 1- to 2-day-old insects (N = 3). A gas chromatograph (Schimadzu, GC-2010) equipped with an Rtx-5 column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Restek®) was used for the analyses. The same chromatographic parameters described above for GC-FID runs were used for GC-EAD analyses. The column effluent was split with a Y-connector into two 0.25 mm-di branches, with one branch towards the FID at 300°C and the other toward a heated transfer line (200°C) with a connection to the releaser capillary glass. The effluent from the capillary glass was diluted with humidified air.

The antennae were removed from insects previously cold anesthetized, and the last flagellomeres were cut before placing them on Ag electrodes containing conductive gel Spectra 360 (Parker lab. Inc., Hellendoorn, Nederland). The clubs of the antennae were subsequently positioned perpendicularly to the air flow coming from the capillary. The amplification of the electrical signals was performed in a high-impedance amplifier (IDA-4, Syntech Hilversum, Netherlands) and analyzed using the program Syntech GC-EAD32 version 4.6, 2008. A single antenna of an insect was used for each test.

### 3.7. Standards

The linear (C7-C30) hydrocarbons, squalene, nonanal, (*E*)-2-nonenal, (*E*)-2-decenal decanal, (*E,Z*)-2,4-decadienal, nonanol, dodecanol, tetradecanol, hexadecanol, octadecanol, docosanol, nonanoic acid, dodecanoic acid, myristic acid, palmitoleic acid, palmitic acid, linoleic acid, oleic acid, and geranyl acetone were purchased from Sigma-Aldrich, and 2,13-octadecadienol diastereomers were kindly donated by Dr. Wittko Francke from the University of Hamburg.

## 4. RESULTS

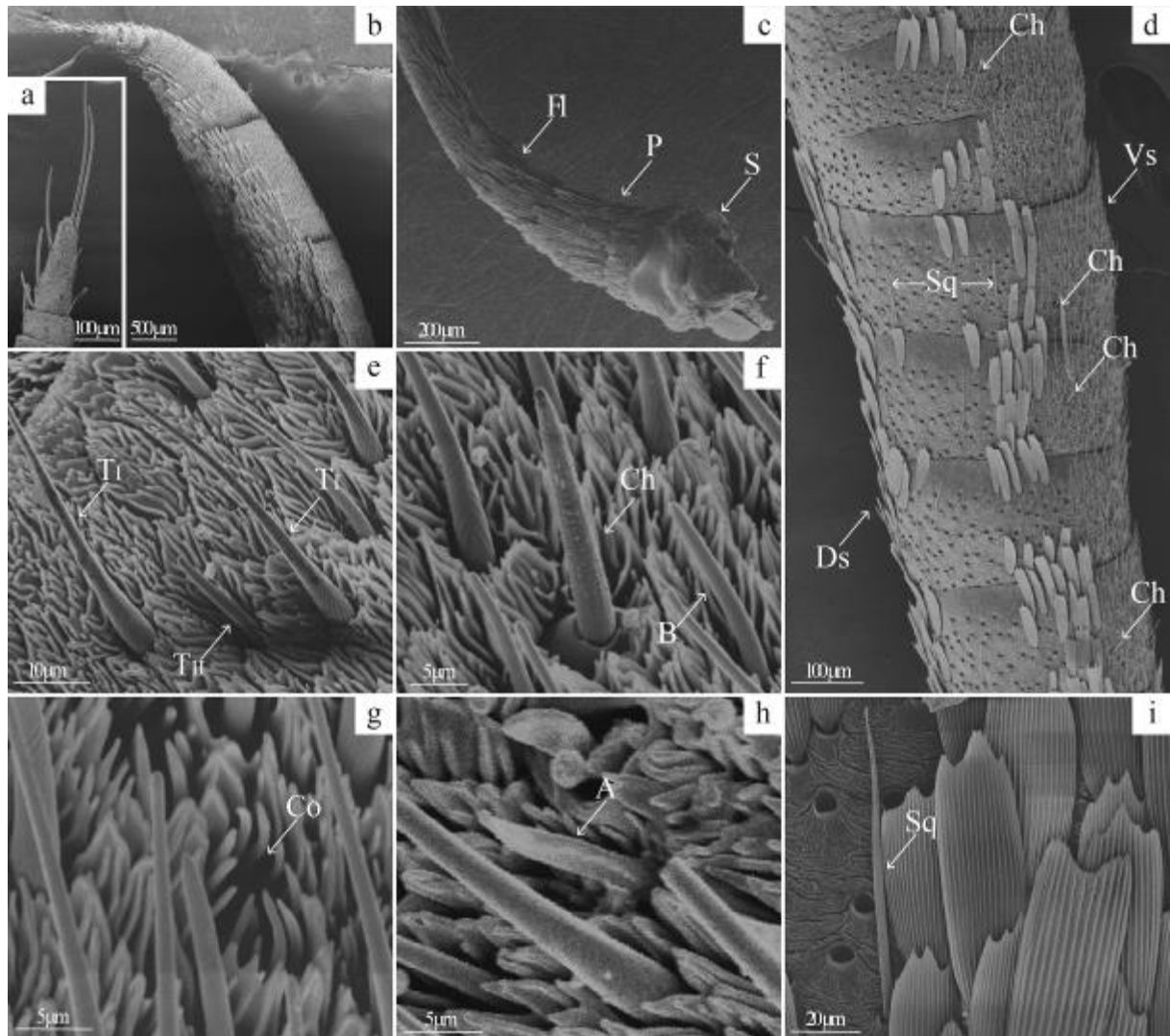
### 4.1. Morphological analysis of antennae

The antennae of both sexes of *T. licus* are clubbed (Fig 1) and consisted of three segments: the scape, pedicel and flagellum, with the latter composed of 62-69 flagellomeres that end up as an apiculus (Fig 2a and 2b). The surfaces of the scape, pedicel and the first flagellomeres are covered with overlapping scales (Fig 2c). The lengths of the antennae and scapes of males were longer than those of females ( $p < 0.05$ ; Table 1). The flagellomeres are subcylindrical, gradually flattening up to the clubbed region, and their number was not significantly different between the sexes. The last flagellomere is more elongated and forms the apiculus that exhibits the largest trichoid sensilla in the antenna.

**Fig 1.** The giant borer of sugarcane *Telchin licus*.



Female and male *T. licus* as seen from the dorsal side. The apparent difference in the size of the male and female specimens in this illustration does not represent any form of sexual dimorphism.

**Fig 2.** General morphology of male and female *Telchin licus* antennae.

Microphotographs showing the (a) apiculus; (b) club; (c) antenna base with scape (S), pedicel (P) and the first segments of the flagellum (F1); and (d) flagellum composed of a ventral (Vs) and a dorsal (Ds) surface, with distribution of squamiform (Sq) and chaetic (Ch) sensilla. (e) Trichoid sensilla (TI, TII). (f) Basiconic sensilla (B) and chaetic sensilla (Ch). (g) Coeloconic sensilla (Co). (h) Auricillica sensilla (A). (i) Squamiform sensilla (Sq).

**Table 1.** General characteristics of male and female *Telchin licus* antennae

	Antenna length	Scape		Pedicel		No. of flagellomeres
	( $\mu\text{m}$ )	Length ( $\mu\text{m}$ )	Width ( $\mu\text{m}$ )	Length ( $\mu\text{m}$ )	Width ( $\mu\text{m}$ )	
♀	18180.1 $\pm$ 252.3	527.2 $\pm$ 36.8	662.8 $\pm$ 46.6	325.9 $\pm$ 19.1	278.6 $\pm$ 15.2	67 $\pm$ 2
♂	19805.7 $\pm$ 338.4*	770.2 $\pm$ 74.6*	784.3 $\pm$ 68.8	320.1 $\pm$ 41.6	421.9 $\pm$ 59.6*	64 $\pm$ 2

Values are presented as the means  $\pm$  SEM. Differences between the means for the sexes in each column followed by \* are significant ( $p < 0.05$ ; independent-sample t-test,  $N = 5$  per sex).



The flagellum has dorsal and ventral surfaces. The dorsal surface is covered with scales and some squamiform sensilla spread between the scales (Fig 2d). On the other hand, an abundant distribution of sensilla can be found on the ventral surface. The length of the flagellar segments decreased from the base to the apex (from  $375.6 \pm 1.1 \mu\text{m}$  between the 5<sup>th</sup> to the 20<sup>th</sup> flagellomeres to  $54.7 \pm 0.6 \mu\text{m}$  in the last five segments,  $N = 5$ ), while the width was prominent in the clubbed area ( $625.9 \pm 27.8 \mu\text{m}$  in females and  $757.1 \pm 19.9 \mu\text{m}$  in males between 45<sup>th</sup> to 50<sup>th</sup> flagellomeres,  $N = 5$  per sex).

Six morphological types of sensilla were observed on the ventral surface of the flagellomeres from female and male *T. licus*, namely, trichoid, basiconic, chaetic, squamiform, coeloconic and auricillica. The trichoid sensilla are the most abundant type of sensilla in the antennae of *T. licus*. We observed two subtypes, trichoid I and trichoid II ( $T_{\text{I}}$  and  $T_{\text{II}}$ ), according to the substructure of the surface and the length (Fig 2e). The  $T_{\text{I}}$  sensilla are distributed throughout the ventral surface, except for on the first segments of the antenna. They exhibit a round base with a long cylindrical axis that decreases towards the tip, being slightly curved towards the apex. Their surface has loop-shaped annular grooves inclined toward the tip (Fig 2e). In addition, the  $T_{\text{I}}$  lengths differ between sexes, as shown by their values of  $46.4 \pm 0.8 \mu\text{m}$  in females and  $43.5 \pm 1.1 \mu\text{m}$  in males ( $p < 0.05$ , Table 2).  $T_{\text{II}}$  are less abundant than  $T_{\text{I}}$ , and they are initially distributed between the 18<sup>th</sup> and the 20<sup>th</sup> flagellomeres, reaching maximum density in the clubbed area between the 40<sup>th</sup> and 50<sup>th</sup> flagellomeres. Their morphological features include a smooth cuticular surface and a cylindrical axis. For comparison purposes, the length of  $T_{\text{II}}$  is approximately three times smaller than that of  $T_{\text{I}}$  (Table 2).

**Table 2.** Morphological features of male and female *Telchin licus* antennal sensilla.

Sensilla type	Gender	Length ( $\mu\text{m}$ )	Basal width ( $\mu\text{m}$ )	No. of sensilla/100 $\mu\text{m}^2$
<b>S. trichoid I</b>	♀	46.4 $\pm$ 0.8*	4.3 $\pm$ 0.1	20.7 $\pm$ 2.4
	♂	43.5 $\pm$ 1.1	4.3 $\pm$ 0.2	20.0 $\pm$ 2.1
<b>S. trichoid II</b>	♀	17.1 $\pm$ 0.7	2.6 $\pm$ 0.1*	6.7 $\pm$ 0.3
	♂	16.7 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.1	7.7 $\pm$ 1.2
<b>S. basiconic</b>	♀	27.8 $\pm$ 0.7	3.0 $\pm$ 0.1	6.0 $\pm$ 0.6
	♂	26.8 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.1	4.3 $\pm$ 0.7
<b>S. chaetic</b>	♀	38.7 $\pm$ 2.3*	9.9 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.0
	♂	29.3 $\pm$ 1.6	9.6 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.0
<b>S. squamiform</b>	♀	77.4 $\pm$ 2.0	3.6 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.0
	♂	71.9 $\pm$ 2.1	3.3 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.0
<b>S. coeloconic</b>	♀	-	11.1 $\pm$ 0.8	5.3 $\pm$ 1.2
	♂	-	11.0 $\pm$ 0.4	6.0 $\pm$ 1.5
<b>S. auricillica</b>	♀	11.1 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 1.2
	♂	13.8 $\pm$ 0.3*	2.7 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.9

Values are presented as the means  $\pm$  SEM. Differences between the means for the gender in each column followed by \* are significant ( $p < 0.05$ ; independent-sample t-test,  $N = 12$  per type of sensilla). The number of sensilla was quantified in areas of 100  $\mu\text{m}^2$  in the club ( $N=5$  per sex).

The basiconic sensilla (Fig 2f) appear to have the same distribution as that of  $T_{II}$ . The axis is cylindrical with a conical end and is slightly curved toward the tip of the antenna. No sexual dimorphism was observed for these sensilla.

One to three chaetic sensilla are distributed in the flagellum from the 14<sup>th</sup> to 16<sup>th</sup> antennal segment (Fig 2d). These sensilla have a sharp, pointed shape and a broad base and are surrounded by a round collar, typically being vertical or with a slope of 60° toward the surface of the antenna. The length is slightly shorter than that of  $T_I$ , and the cuticle is rough with longitudinal grooves (Fig 2f). Those sensilla are longer in female individuals (38.7  $\pm$  2.3  $\mu\text{m}$  in females and 29.3  $\pm$  1.6  $\mu\text{m}$  in males,  $p < 0.05$ , Table 2).

One to six coeloconic sensilla in each flagellar segment are mainly distributed in the clubbed area of the antenna, which are composed of 11-14 small smooth spiked structures with a circular base that surrounds a central sensilla (Fig 2g).

The auricillica sensilla are less abundant and they are spread mainly through the sides of the flagellomeres around the scales. These sensilla are bent towards the apex and are almost parallel to the surface of the antenna. They have a smooth cuticular surface with the appearance of a leaf (Fig 2h), being larger in the male antenna than the female ( $11.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$  in female and  $13.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$  in male,  $p < 0.05$ ; Table 2).

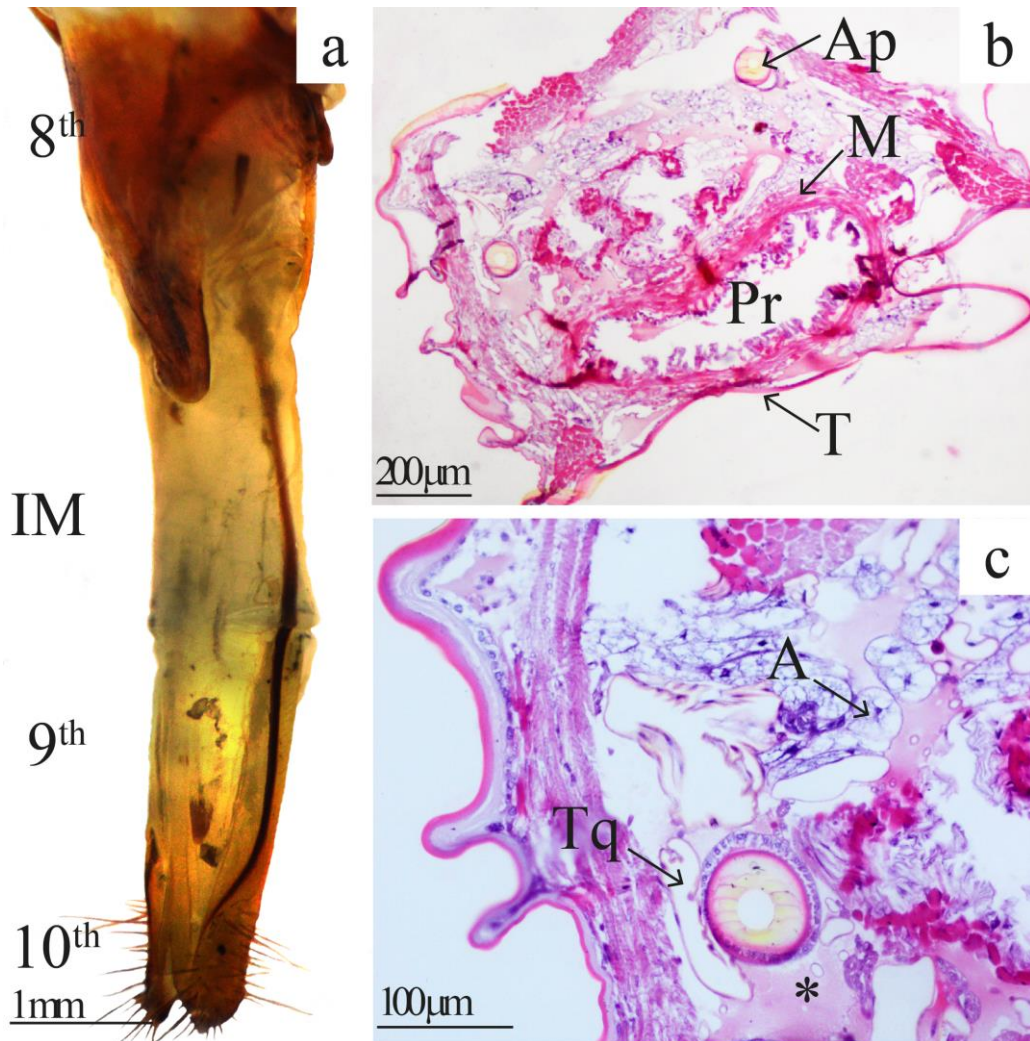
Squamiform sensilla are distributed on the dorsal surface of the flagellum and are covered with scales (Fig 2d). There is greater density between the 10<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> flagellomeres, with these sensilla being absent from the end of the club. They are elongated and flat with grooves arranged longitudinally, similar to the texture of the scales but of smaller length and width (Fig 2i).

#### **4.2. Morpho-histological analysis of the ovipositor**

*T. licus* has a telescopic ovipositor formed by the last three abdominal segments. The 8<sup>th</sup> segment is highly sclerotized uromere (length  $3.27 \pm 0.04 \text{ mm}$ ,  $N = 4$ ) forms the base of the ovipositor, while the ninth and tenth uromeres are fused (length  $3.26 \pm 0.05 \text{ mm}$ ,  $N = 4$ ). The apical part forms the anal papillae, which in turn are characterized by the abundant presence of long sensilla (length  $655 \pm 5 \mu\text{m}$ ,  $N = 12$ ). The ninth and tenth uromeres are connected to the eighth through an intersegmental membrane (length  $3.24 \pm 0.03 \text{ mm}$ ,  $N = 4$ ).

The entire surface of the ovipositor is smooth, and a pair of apophyses appears laterally from the anal papillae and fuses to the intersegmental membrane up to the eighth uromere (Fig 3a). In the resting position, the ovipositor is completely retracted under the abdomen. Histological sections on the intersegmental membrane show a tegument from a thick cuticle on a single layer of cuboidal epithelial cells resting on a thin basement membrane. The apodemes are surrounded by a layer of cubic epithelium followed by muscle tissue. The proctodeum is also surrounded by muscle cells. Furthermore, the intersegmental membrane contains a trachea and a high amount of connective tissue surrounded by hyaline eosinophilic fluid (Fig 3b and 3c).

**Fig 3.** Morpho-histological features of the ovipositor of *Telchin licus*.



(a) Dorsolateral view of the ovipositor of *T. licus* showing the 8th uromere, intersegmental membrane (IM), and 9th and 10th uromeres. (b) Cross-section of intersegmental membrane showing the tegument (T), muscles (M), proctodeum (Pr) and apodemes (Ap). (c) Enlargement of the cross-sectional area of the intersegmental membrane showing the trachea (Tq), adipose tissue (A) and hyaline eosinophilic fluid (\*).

#### **4.3. Chemical composition of *T. licus* body extracts**

Saturated and monounsaturated hydrocarbons, mainly as long chains (>20 carbons), are the major compounds in the body extracts of females and males of *T. licus*. These hydrocarbons correspond to 56% and 64% of the total composition of females and males, respectively. Saturated, mono- and diunsaturated aldehydes with chains of from 8 to 26 carbons were identified with relative abundances of 10% in females and 2% in males. In addition, we managed to identify saturated alcohols with chains ranging from 9 to 26 carbons and Z2,E13-18:OH and E2,Z13-18:OH, present mostly on the male legs. Seven carboxylic acids, two ketones, two esters and three terpenoids are the minor components in the extracts. A total of 76 compounds was identified (Table 3).

**Table 3.** Composition of male and female body extracts of *Telchin licus*.

KI <sup>a</sup>	Compound	Female						Male							
		AB	TX	HW	FW	L	G	AB	TX	HW	FW	L	G		
<b>HYDROCARBONS</b>		<b>M<sup>+</sup></b>	<b>B</b>	<b>M<sup>+</sup>-18</b>											
1202	Dodecane	170	57			Std	+		+				+		
1301	Tridecane	184	57			Std	+		+		+		+		
1401	Tetradecane	198	57			Std	+		+		+		+		
1493	Pentadecene	210	69				+		+		+		+		
1501	Pentadecane	212	57			Std	+		+		+		+		
1566	Metil- pentadecane <sup>♂</sup>	226	57								+			+	
1602	Hexadecane	226	57			Std			+		+		+		
1702	Heptadecane	240	71			Std		+			+		+		
1802	Octadecane	254	71			Std				+			+	+	
1901	Nonadecane <sup>♂</sup>	268	57			Std					+			+	
2001	Eicosane	282	71			Std			+	+			+	+	
2101	Heneicosane	296	71			Std	+	+	+	+	+		+	+	
2201	Docosane	310	71			Std	+	+	+	+	+		+	+	
2302	Tricosane	324	57			Std	++	+++	+++	+++	++++	+	+++	+++	+
2402	Tetracosane	338	71			Std		+	+	+	+		+	+	
2497	Pentacosene <sup>♂</sup>	350	97										+		
2502	Pentacosane	352	57			Std	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+
2598	Hexacosene <sup>♂</sup>	364	97										+		
2602	Hexacosane	366	71			Std	+	+	+	+	+		+++	+	+
2703	Heptacosane	380	71			Std	++++	+++	+++	+++	++++	++	++++	++++	+
2802	Octacosane	394	71			Std	+	+	+	+	+		+++	+	+
2900	Nonacosane	408	71			Std		+++		++++		+	++++	+++	+
<b>ALDEHYDE</b>															
1001	Octanal	128	43	110			+		+	+	+		+	+	
1103	Nonanal	142	57	124	Std		++	+	+	+	+	+	+	+	+
1161	2-Nonenal	140	70	122	Std		+	+	+	+	+		+	+	
1205	Decanal	156	43	138	Std		+	+	+	+	+		+	+	+
1263	2-Decenal	154	70	136	Std		+	+	+	+	+		+	+	
1296	2,4-Decadienal <sup>♂</sup>	152	81		Std								+	+	
1307	Undecanal	170	43	152			+	+	+	+	+		+	+	+
1319	Decadienal	152	81				+		+				+	+	
1366	Undecenal	168	70	150			+	+	+				+	+	
1410	Dodecanal	184	43				+	+	+	+	+		+	+	+
1513	Tridecanal	198	43				+	+	+	+	+		+	+	
1615	Tetradecanal	212	43				+	+					+	+	
1675	Tetradecenal <sup>♀</sup>	210	41	192			+						+	+	
1716	Pentadecanal	226	82	208			+	+	+	+	+		+	+	
1806	9-Hexadecenal	238	55				+						+	+	
1818	Hexadecanal	240	82				+++	+	++		+		+	+	
1900	Heptadecenal	252	41	234					+				+	+	
1921	Heptadecanal	254	82	236							+			+	
2001	9-Octadecenal <sup>♀</sup>	266	55	248			+								
2022	Octadecanal	268	82	250			+				+		+		
2126	Nonadecanal <sup>♂</sup>	282	82	264											
2227	Eicosanal <sup>♂</sup>	296	82	278									+		+
2430	Docosanal <sup>♂</sup>	324	82	306									+		+
2531	Tricosanal <sup>♂</sup>	338	82	320									+		
2631	Tetracosanal	352	82	334					+	+	+		+	+	
2834	Hexacosanal	380	82	362					+	+			+	+	

KI <sup>a</sup>	Compound				Female						Male								
					AB	TX	HW	FW	L	G	AB	TX	HW	FW	L	G			
<b>ALCOHOLS</b>		<b>M<sup>+</sup></b>	<b>B</b>	<b>M<sup>+</sup>-18</b>															
1170	Nonanol	144	43		Std	+	+	+	+										
1372	Undecanol <sup>♀</sup>	172	55	154		+		+		+									
1474	Dodecanol <sup>♀</sup>	186	43	168	Std	+	+	+											
1676	Tetradecanol	214	43	196		+	+	+	+	+	+			+	+				
1880	Hexadecanol	242	83	224	Std	+	+	+	+++	+	+			+	+		+		
2075	Octadecanol	270	83	252		+	+	++	+++	+	+			+	+		+		
2084	(Z,E)/(E,Z)-2,13-Octadecadienol	266	55	248	Std									+	+	+	+	+++	
2296	Eicosanol <sup>♂</sup>	298	97	280											+				
2396	Heneicosanol <sup>♂</sup>	312	97	294											+				
2494	Docosanol	326	97	308	Std				+					+	+		+	+	
2596	Tricosanol <sup>♂</sup>	340	57	322											+				
2698	Tetracosanol <sup>♂</sup>		97	336										++	++			++	
2878	Hexacosanol <sup>♂</sup>		97	364										+	+				
<b>CARBOXYLIC ACIDS</b>																			
1259	Nonanoic acid	158	60		Std													+	
1554	Dodecanoic acid	200	73		Std														+
1752	Tetradecanoic acid	228	73		Std													+	+
1939	(Z)-9-Hexadecenoic acid	254	69		Std									+				+	+
1956	Hexadecanoic acid	256	73		Std									+	+			+	+
2131	(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic acid	280	67		Std													+	
2137	(Z)-9-Octadecenoic acid	282	55		Std									+				+	+
<b>KETONES</b>																			
1192	2-Decanone	156	43			+		+		+									
1699	2-Pentadecanone	226	43			+		+	+	+	+								+
<b>ESTERS</b>																			
1924	Methyl hexadecanoate	270	74		Std					+				+	+				+
2006	Hexadecanyl acetate	284	43						+	+	+							+	+
<b>TERPENOIDS</b>																			
1455	Geranyl acetone	194	43		Std	+		+	+	+				+	+			+	+
1845	Trimethyl tridecatrienal	248	69			+		+	+									+	+
2827	Squalene	410	69		Std	+	+	++	+++	++				+	+			+	+

a Kovats index on a Rtx-5 column.

b Std, identification based on standard

M<sup>+</sup>: Molecular ion peak; B: Base peak; M<sup>+</sup>-18: Molecular ion peak - H<sub>2</sub>O

Relative abundance in the abdomen (AB), thorax (TX), hindwings (HW), forewings (FW), legs (L) and genitalia (G).

+ Relative abundance < 0.5%

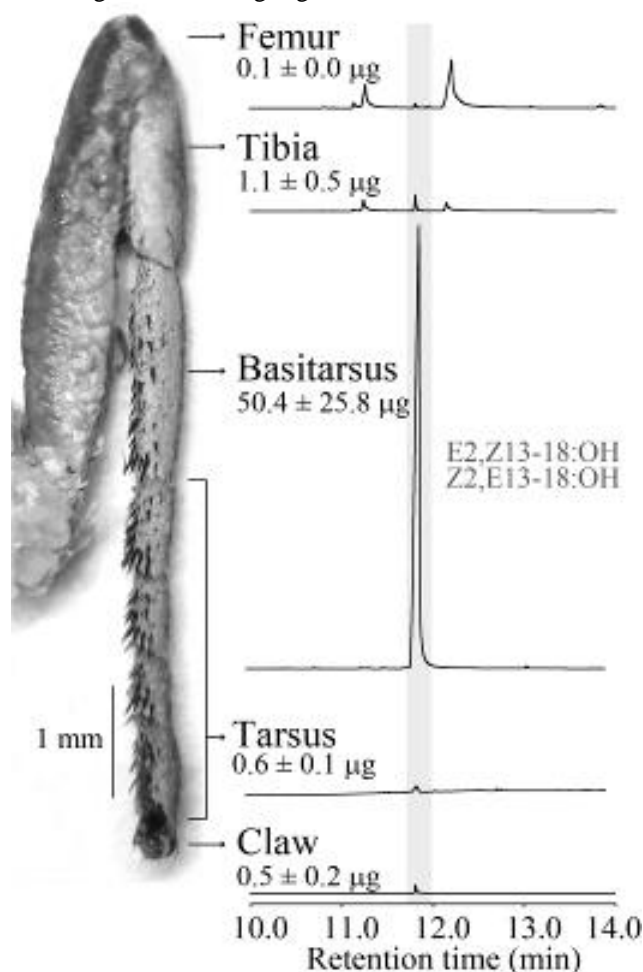
++ Relative abundance 0.5% - 1%

+++ Relative abundance 1% - 5%

++++ Relative abundance 5% - 12%

The mixture of Z2,E13-18:OH and E2,Z13-18:OH was identified in a higher concentration from the mid-leg extract of males (S1 Fig) more specifically, from mid-leg basitarsus (Fig 4). The total quantity of these compounds in the basitarsus extracts was calculated to be  $50.4 \pm 25.8 \mu\text{g}/\text{male}$  (N = 3). Morphologically, the mid-leg basitarsus of males and females differ significantly in length ( $3.26 \pm 0.04 \mu\text{m}$  in females and  $3.78 \pm 0.03 \mu\text{m}$  in males,  $p < 0.05$ , N = 5) and in width ( $0.58 \pm 0.02 \mu\text{m}$  in females and  $0.77 \pm 0.03 \mu\text{m}$  in males,  $p < 0.05$ , N = 5) (S2 Fig).

**Fig 4.** Chromatogram of mid-leg segments of male *Telchin licus*.



Chromatogram showing the presence of Z2,E13-18:OH and E2,Z13-18:OH (highlighted) and the amount of the diastereoisomers mixture in each mid-leg segment per male (means  $\pm$  SEM). GC-FID equipped with the capillary column Rtx-5.

The coelution of Z2,E13-18:OH and E2,Z13-18:OH was observed in low-polarity column (Rtx-5), however in polar column (Rtx-Wax) these can be differentiated (Table 3). In the basitarsus extracts of male mid-legs, these alcohols were found as a mixture at 20:80 ratio, respectively (Fig 5a).

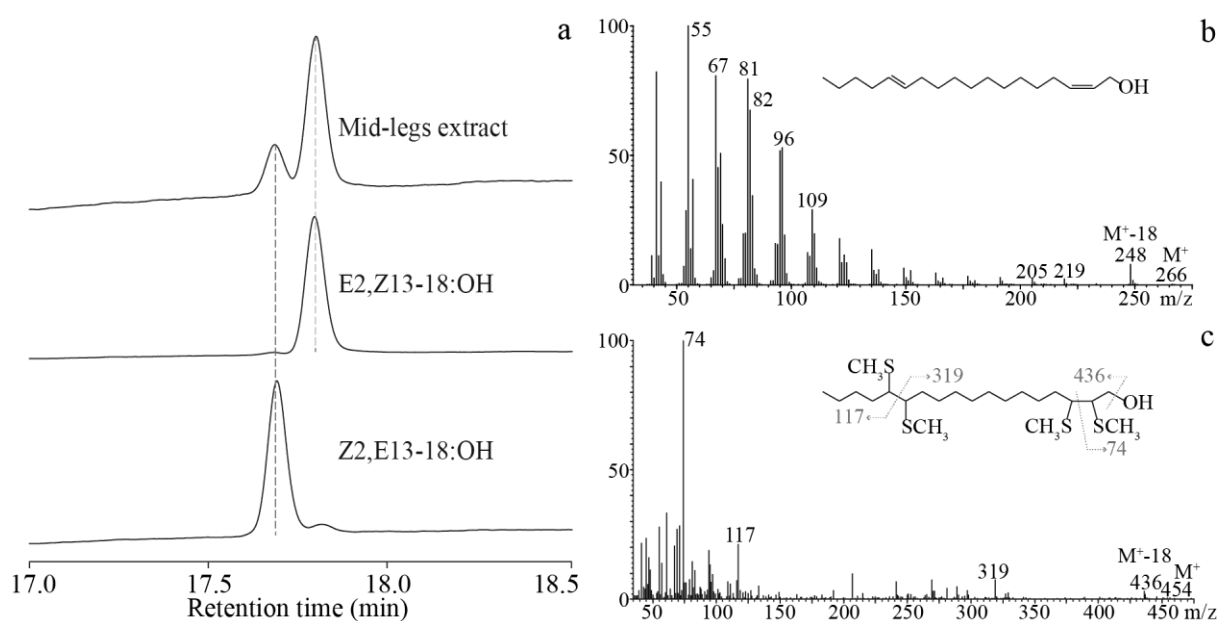
The mass spectrum of E2,Z13-18:OH in the mid-legs showed a small molecular ion peak of  $m/z$  266 (0.1%  $M^+$ ) and the  $m/z$  248 ion peak (5.4%) corresponding to the loss of a water molecule [ $M^+ - 18$ ]. The base peak corresponds to the cation  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_2]^+$  of  $m/z$  55 (100%). The molecule undergoes rearrangement and the migration of hydrogen, leading to the formation of a series of homologous  $[\text{CH}_2(\text{CH})_3(\text{CH}_2)_n]^+$  cations that generate  $m/z$  109 (29.0%),  $m/z$  95 (51.8%),  $m/z$  81 (79.4%) and  $m/z$  67 (80.7%) ions. Moreover, dehydration leads to the formation of a three-double bond fragment series of homologous  $[\text{CH}_2(\text{CH})_4(\text{CH}_2)_n]^+$  cations, resulting in  $m/z$  233 (0.3%),  $m/z$  219 (2.2%),  $m/z$  205 (2.3%) and

further sequential losses of methylene radicals (Fig 5b). The analysis of DMDS adducts from the extract led to observation of the fragments  $m/z$  74 (100%),  $m/z$  117 (21.3%) and  $m/z$  319 (7.5%), which, in turn, confirmed the position of the double bond at C(2) and C(13) in 2,13-octadecadienol (Fig 5c).

**Table 4.** Kovats indices for synthetic and natural 2,13-octadecadienol diastereoisomers in different polarity columns

	Rtx-5	Rtx-Wax
<b>E2,E13-18OH</b>	2080	2666
<b>Z2,E13-18OH</b>	2083	2665
<b>E2,Z13-18OH</b>	2083	2672
<b>Z2,Z13-18OH</b>	2085	2671
<b>Mid-legs</b>	2084	2664 2672

**Fig 5.** Configuration assignment of 2,13-octadecadienol in the mid-legs from male *Telchin licus*.



(a) Chromatograms of the mid-legs extract of male *T. licus*, Z2,E13-18:OH and E2,Z13-18:OH. GC-FID equipped with the capillary column Rtx-Wax. (b) Mass spectra (EI) of (Z,E)/(E,Z) 2,13-octadecadienol in male mid-legs and (c) corresponding DMDS adducts. Each spectrum shows diagnostic fragment ions, and the adducts show the fragment ions produced by cleavage of the bond between the sulfur-substituted carbons, indicating position 2 and 13 of the double bonds.

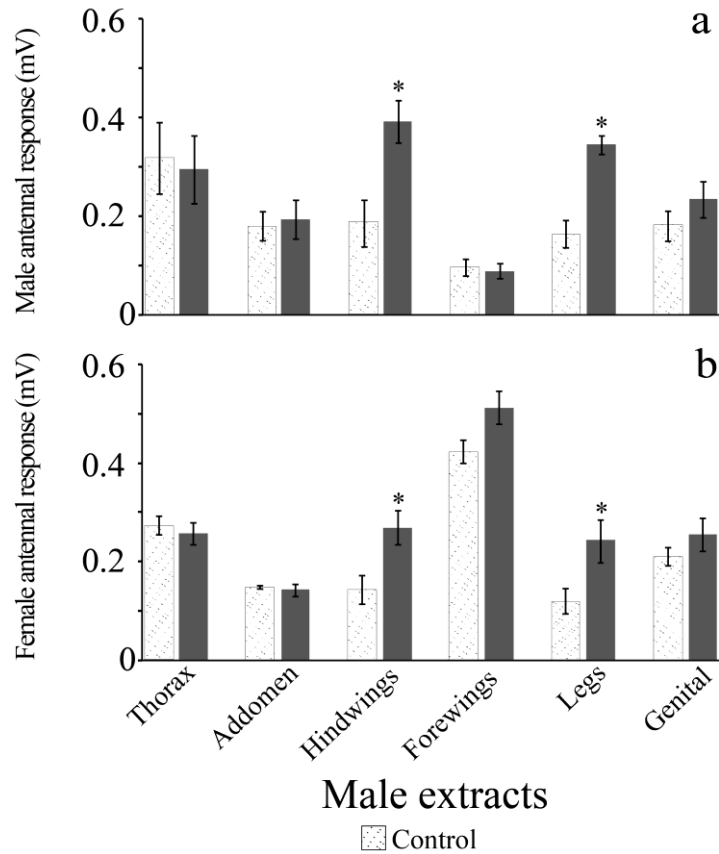
#### 4.4. EAG Analysis

Extracts of the hindwings and legs of *T. licus* males showed significantly different EAG responses in female and male antennae when compared to the control ( $0.39 \pm 0.04$  mV in males and  $0.27 \pm 0.03$  mV in females versus male hindwings and  $0.34 \pm 0.02$  mV in males and  $0.23 \pm 0.04$  mV in females against male legs,  $p < 0.05$ ,  $N = 8$  per sex) (Fig 6). On the



other hand, female body extracts did not trigger responses with significant differences in the antennae of either gender when compared to the negative control (hexane).

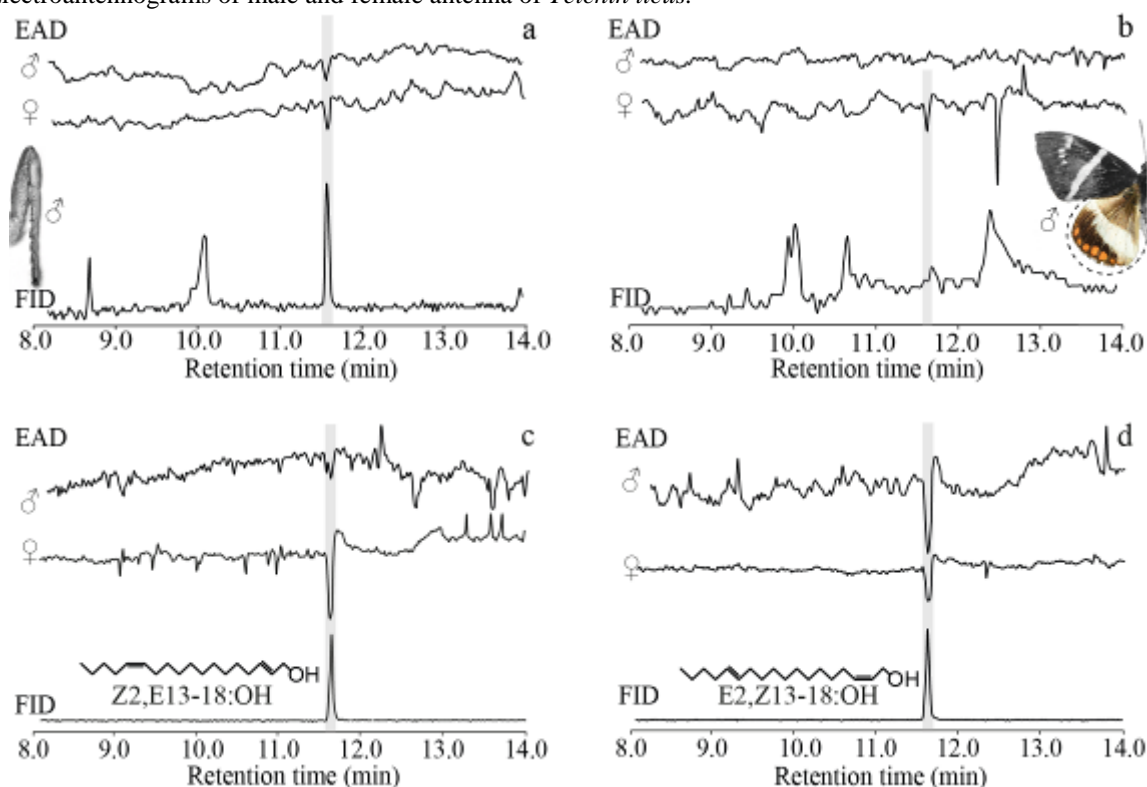
**Fig 6.** Electroantennographic responses to male body extracts of *Telchin licus*.



Mean ( $\pm$  SEM) electroantennographic responses for the antennae of male(a) and female(b) of *T. licus* to male body extracts. Bars surmounted by (\*) were significantly different compared to hexane ( $p < 0.05$ ; Mann-Whitney test).

Analysis by GC-EAD showed that only Z2,E13-18:OH or E2,Z13-18:OH in the male's mid-legs has constant electroantennographic activity in female and male antenna. However, the low concentration of Z2,E13-18:OH or E2,Z13-18:OH in male hindwings ( $0.3 \pm 0.1 \mu\text{g}$  per male,  $N = 3$ ) just elicited a response in females (Fig 7a and 7b). Additionally, the diastereoisomers Z2,E13-18:OH and E2,Z13-18:OH (authentic standards) showed electroantennographic activity in both sexes (Fig 7c and 7d).

**Fig 7.** Electroantennograms of male and female antenna of *Telchin licus*.



(a) Male mid-legs. (b) Male hindwings. (c) Z2,E13-18:OH.(d) E2,Z13-18:OH. GC-EAD equipped with the capillary column Rtx-5.

## 5. DISCUSSION

### 5.1. Morphological analysis of antennae

Antennae are the primary sense organs specialized for detecting odorant molecules in insects. These chemical signals are involved in sexual communication and are indispensable for Lepidoptera mating behavior. Our morphological analyses verified that the clubbed antennae in both sexes of *T. licus* are similar to the antennae of other moths in Castniidae and Sesiidae [12,13,30-32], as well as to those of butterflies from Hesperidae and Papilionidae [33,34].

The arrangement of the antennae, with a ventral surface filled with numerous sensilla and a dorsal surface covered with overlapping scales, has been speculated as a physical protection barrier for the sensilla [35] and a mechanism by which to trap and concentrate odorant molecules [36]. The insects groom their antennae with specialized cleaning structures to enhance olfactory acuity [37], as observed for *P. archon* [24]. Similar structures denoted as epiphyses in the fore-legs of *T. licus* might carry out this same function (S2 Fig 8).

Previous investigations in Lepidoptera specimens have shown the presence of pores in antennae sensilla cuticles, a feature that correlates to a chemoreception role [38], although we did not observe pores for *T. licus* sensilla. Further ultrastructural studies will be necessary to verify the porosity of its sensilla and whether they may be associated with olfaction in *T.licus*.

The subtype T<sub>I</sub> of sensilla was the most abundant on the antennae of *T. licus*. Its biological function in Lepidoptera is directly related to the reception of sex pheromones [39] as observed in the vine root borer *Vitacea polistiformis* (Harris, 1854) (Lepidoptera: Sesiidae) [40]. On the other hand, T<sub>II</sub> has been shown to be active when exposed to volatiles of plants [41] or to the conspecific sex pheromone in *Chloridea virescens* females (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae) [42].

The olfactory receptors present in the basiconic sensilla also respond to host volatiles or pheromones [41,43]. For instance, the female basiconic sensilla have receptors for the male pheromone in *Utetheisa ornatrix* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Erebidae) [44].

The coeloconic sensilla have receptors specialized for the detection of host volatiles and mediate the choice of the place of oviposition [45,46]. However, in *T. licus*, as in *P. archon* [32], these sensilla are recessed on the antenna surface on the sides around the scales, which is not ideal for receiving chemical stimuli but is probably a necessary adaptation to avoid desiccation [47], since thermohygroreceptor functions have also been reported for this type of sensilla [48].

The olfactory function of the auricillica sensilla is diverse in Lepidoptera. In *Scoliopteryx libatrix* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Erebidae) the olfactory receptors of these sensilla play a role in the detection of plant volatiles [49], but in *Eriocrania* spp. (Lepidoptera: Eriocraniidae), they also contain receptors for sex pheromones [50]. Further molecular and electrophysiological investigations are necessary to elucidate the biological function of each sensilla herein reported in *T. licus*.

The morphological differences observed between the antennae of females and males *T. licus* are subtle, so that *T. licus* is expected to have a generalist olfactory system. The diurnal habit of this species and the use of other communication cues such as visuals may allow a less-complex olfaction system than those required by moths with crepuscular or nocturnal habits, as these moths rely heavily on smell to find food and oviposition sites and, especially, to detect low concentrations of sex pheromones.

## 5.2. Morpho-histological analysis of the ovipositor

In moths, sex pheromones are usually produced by the female sexual gland. This is commonly located between the 8th and 9th abdominal segment in the intersegmental membrane. During the calling behavior, this glandular area is exposed, and the pheromone is released [51]. However, female Castniidae apparently lack a calling behavior. Riolo et al. (2014) observed ovipositor extrusion in *P. archon*, but concluded that this behavior might be involved in the female physiological state of egg loading or in thermoregulation activity.

The ovipositor surface of *T. licus* does not exhibit structural modifications (protuberances or grooves) in the intersegmental membrane, a feature that is usually present in moth pheromone glands [52,53]. In our histological investigation, we observed the presence of eosinophilic hyaline fluid, probably hemolymph, due to its mechanical utility in ovipositor movements of eversion and retraction of the intersegmental membrane [54]. Additionally, we found no evidence of glandular cells.

There are few studies examining evidence of gland-releasing pheromones in Castniidae. Histological and morphological analyses of the ovipositor of *P. archon* revealed the absence of glandular cells [13,24], just as we observed for *T. licus*. Despite these findings, other scent-producing organs in Lepidopteran males have been described. In many species, scent-producing organs are located in the abdomen, thorax, legs and wings. Such organs range from simple scales and tufts of hair to complex eversible structures [55].

The volatile secretions emitted by these organs have been described [18,56-58], and often, these compounds occur exclusively when the male is close to the female, thus being considered important in courtship behavior [55]. In Castniidae, males exhibit several androconia, with most located in the abdomen and legs [59].

## 5.3. Chemical composition of *T. licus* body extracts

In the search for scent-producing organs, which release pheromones used for intraspecific chemical communication in *T. licus*, hexane body extracts of both sexes were tested in electrophysiological analyses, and our results revealed that the male hindwings and leg extracts had clearly differentiated activity in females and males antennae (Fig 6). In this way, males would be responsible for the release of semiochemicals in this species.

Chemical analysis revealed a wide diversity of compounds in the extracts, among which linear hydrocarbons with chains between C12 and C29 were the most abundant compounds. These hydrocarbons are commonly present in the cuticles of insects [60], fulfilling various biological functions such as protection, serving as male sex pheromones [61,62] and serving as short-range stimulant compounds [63].

In the Castniidae family, a series of linear saturated hydrocarbons of 14 to 17 carbon atoms was identified in the ovipositor of *P. archon* [24], and a series of 21 to 27 carbon atoms was reported in a previous study of the *T. licus* ovipositor [28], but no electrophysiological activity has been found for these compounds.

Low-molecular weight aldehydes including the nonanal and decanal distributed throughout the body of male and female *T.licus* have also been reported as abundant compounds in the ovipositor of *P. archon* [24]. Moreover, fatty acids are common in body extracts of insects [64]. Palmitic, palmitoleic, linoleic and oleic acids were previously reported in *T. licus* [28], although only palmitic and oleic acids were found in *P. archon* females [13,24]. The nonanoic and dodecanoic acids identified on wings of *T. licus* males were previously reported as being part of the androconia compounds in the species *Amauris* spp. (Lepidoptera: Nymphalidae) [65] and *Papilio* spp. (Lepidoptera: Papilionidae) [66]. These short-chain carboxylic acids exhibit strong antimicrobial activity [67] and may therefore be suggested as defense compounds in *T. licus*.

Methyl hexadecanoate and hexadecanyl acetate were found mainly in the legs and wings of *T. licus* males and females. The biological roles of these esters may be diverse, since hexadecanyl acetate was reported as one of the male wing compounds that facilitates courtship in *Lycaeides argyrognomon* (Lepidoptera: Lycaenidae) [68], in addition to being described in the male pheromone glands of *C. virescens* [69].

Minor compounds in *T. licus* such as geranyl acetone, squalene, 2-decanone and 2-pentadecanone were previously described in Lepidoptera. Geranyl acetone was found in the ovipositor of *P. archon* [24] and in another castnid, *Eupalamides cyparissias* (Fabricius, 1776), whose antennae showed an electrophysiological response to another geranyl derivative in male hindwing extracts [70]. Squalene is a compound that is only absent from the female genitalia of *T. licus*. This terpene is biologically important since it serves as a biosynthetic precursor of cholesterol. As expected, it is also in the body extracts of lepidopteran species

[66,71]. For instance, 2-pentadecanone has been reported in the ovipositor of *Acleris minuta* (Robinson, 1869) (Lepidoptera: Tortricidae) [72], and other ketones have been determined as part of the composition of androconia in species of the genus *Amauris* [65].

Although several compounds were identified and could serve as putative pheromones on the basis of their similarity to type I female sex pheromone structures, only male hindwing and leg extracts showed in common a mixture of E2,Z13-18:OH and Z2,E13-18:OH that elicited electroantennographic activity from both female and male antennae (Fig 7).

E2,Z13-18:OH has been described among the female sex pheromones of Sesiidae and Tineidae [73-75]. It is used as a minor component of female sex pheromone by the sesiid *Paranthrene tabaniformis* (Rottemburg, 1775) and the tineid *Tineola bisselliella* (Hummel, 1823) [76,77]. The fact that these two families use compounds with similar chemical structures is evidence of the close relation between Sesiidae and Castniidae as taxonomically related species that developed from a common ancestor [19], possibly a primitive Tineidae species. In this case, as in many others, the conservation of biosynthetic machinery to produce the same compounds that serve similar functions, with intraespecific communication included, is not restricted to a single sex. As a matter of fact, some compounds utilized as type I female sex pheromones in moths are the very same compounds used in butterflies, although produced by males and serving slightly different but related biological functions [78].

In Castniidae, E2, Z13-18:OH was previously identified in *P. archon* [13,25,26]. Sarto et al. (2012) speculated that E2,Z13-18:OH acts as a male sex pheromone and is released during the courtship flight, inducing the acceptance behavior of the female. However, further experiments allowed for other possibilities, such as that the compound acts as aggregation pheromone, as a scent-marking pheromone to establish territorial boundaries or as a host-marking pheromone [26].

With the exception of the genitals, the mixture of E2,Z13-18:OH and Z2,E13-18:OH was found in all body parts of males *T. licus*, and nearly 93% of their total content is distributed in the abdomen, wings and legs. Quero et al. (2017) speculated that E2,Z13-18:OH in *P. archon* seems to be spread by the brush-like paronychia located at the distal tip of the mid-legs. Similar structures were observed in the three pairs of legs of the male *T. licus* (S2 Fig 9). These compounds could therefore be released by the mid-leg basitarsus in high

concentrations ( $50.4 \pm 25.8 \mu\text{g}/\text{male}$ ) and transferred by contact to other parts of the body, perhaps acting as a short-range pheromone in *T. licus*.

In various insecta orders, the body's surface often includes short-range pheromones to mediate contact and copulation behaviors [66]. Adult lepidopterans make physical contact with the partner's body during the mating process, and male compounds play diverse roles in sexual communication, but they generally act during courtship, leading to a more complex mating behavior [66].

In *P. archon*, mating depends greatly on the success of both sexes flying together [24] because, during this flight, the males apparently transfer compounds with their wings to the antennae of females [13]. In addition, the act of both individuals landing closely after a chase flight indicates male acceptance by females, a behavior reported to be commonly triggered by the presence of short-range pheromones in moths and butterflies [24,79]. Since this behavior has also been described in *T. licus* [23], it is suggestive of a putative short-range pheromone that might correlate to the active E2,Z13-18:OH and Z2,E13-18:OH found in the males.

Our results revealed a diversity of chemical compounds in the bodies of *T. licus* females and males; however, only E2,Z13-18:OH and Z2,E13-18:OH released by mid-legs basitarsus of males appear to be involved in the chemical communication of *T.licus*. The biological implications of the presence of E2,Z13-18:OH and Z2,E13-18:OH within an ecological context remain to be elucidated by further investigations, as the possibilities are various. Nevertheless, the distribution of these compounds in different parts of the male body as well as the fact that the compounds are recognized by the antennae of both sexes, with females mainly being more sensitive to low concentrations, may suggest a male short-range pheromone function.

Most of the recent evidence in Castniidae shows the lack of a calling behavior in females, the presence of developed eyes capable of higher acuity and color sensitivity, male-specific electroactive compounds, a generalist olfactory system and the absence of a female sex pheromone-producing gland. Altogether, these data are strongly suggestive that communication in these moths, similar to communication in butterflies, depends on visual cues to a great extent.

## 6. REFERENCES

1. González J. Castniinae (Lepidoptera: Castniidae) from Venezuela. III: Genera represented by only one known species. *Ciencia*. 1999;7.
2. González JM, Cock MJ. A synopsis of the Castniidae (Lepidoptera) of Trinidad and Tobago. *Zootaxa*. 2004;762: 1-19.
3. Ríos SD, González JM. A synopsis of the Castniidae (Lepidoptera) of Paraguay. *Zootaxa*. 2011: 43-61.
4. Salazar JA, Rodríguez G, Rodríguez C. Datos adicionales sobre Castnidos colombianos (Lepidoptera: Castniidae) Boletín del museo entomológico francisco luís gallego. 2013;5: 17.
5. Atencio R, Goebel F-R, Miranda RJ. Entomofauna associated with sugarcane in Panama. *Sugar Tech*. 2018. doi: 10.1007/s12355-018-0661-8.
6. Silva Junior MPd, Nicola MV, Rossi MM. Broca gigante da cana-de-açúcar, *Telchin licus licus* (Drury, 1773) na região centro-sul: preocupação para os produtores. *Nucleus*. 2008: 49-54. doi: 10.3738/1982.2278.90.
7. Lamas G. Bibliografía de los Castniidae (Lepidoptera) americanos. *Revista Peruana de Entomología*. 1993;35: 13-23.
8. González J, Stünning D. The Castniinae at the zoologisches forschungsmuseum Alexander Koenig, bonn (Lepidoptera: Castniidae). *Entomologische zeitschrift*. 2007;117: 89-93.
9. Dinardo-Miranda LL, Fracasso JV. Sugarcane straw and the populations of pests and nematodes. *Sci Agric*. 2013;70: 305-310.
10. Clarke G, Whyte L. Phylogeography and population history of the endangered golden sun moth (*Synemon plana*) revealed by allozymes and mitochondrial DNA analysis. *Conserv Genet*. 2003;4: 719-734. doi: 10.1023/B:COGE.0000006114.33543.32.
11. Douglas F. The sun-moths (Lepidoptera: Castniidae) of victoria, with a detailed study of the pale sun-moth (*Synemon selene* KLUG, 1850) M. Sc. Thesis, University of Ballarat. 2008. Available from: <http://researchonline.federation.edu.au/vital/access/HandleResolver/1959.17/45568>
12. Moraes SS, Duarte M. Morfologia externa comparada das três espécies do complexo *Telchin licus* (Drury) (Lepidoptera: Castniidae) com uma sinonímia. *Rev Bras Entomol*. 2009;53: 245-265.
13. Sarto iMV, Acin P, Rosell G, Quero C, Jimenez MA, Guerrero A. Moths behaving like butterflies. Evolutionary loss of long range attractant pheromones in castniid moths: a *Paysandisia archon* model. *PloS one*. 2012;7: e29282. doi: 10.1371/journal.pone.0029282.
14. Pirih P, Ilić M, Rudolf J, Arikawa K, Stavenga DG, Belušič G. The giant butterfly-moth *Paysandisia archon* has spectrally rich apposition eyes with unique light-dependent photoreceptor dynamics. *J Comp Physiol A*. 2018. doi: 10.1007/s00359-018-1267-z.
15. Heikkilä M, Mutanen M, Wahlberg N, Sihvonen P, Kaila L. *Elusive ditrysian* phylogeny: an account of combining systematized morphology with molecular data (Lepidoptera). *BMC Evolutionary Biology*. 2015;15: 260.



16. Regier JC, Mitter C, Zwick A, Bazinet AL, Cummings MP, Kawahara AY, et al. A large-scale, higher-level, molecular phylogenetic study of the insect order lepidoptera (moths and butterflies). *PloS one*. 2013;8. doi: 10.1371/journal.pone.0058568.
17. Erik J. Van Nieukerken, Lauri Kaila, Ian J. Kitching, Niels P. Kristensen, David C. Lees JM, Charles Mitter, et al. Order Lepidoptera Linnaeus, 1758. In: Zhang Z-Q, editor. *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness: Zootaxa* 2011. pp. 212–221.
18. Hillier NK, Vickers NJ. Hairpencil volatiles influence interspecific courtship and mating between two related moth species. *J Chem Ecol*. 2011;37: 1127-1136. doi: 10.1007/s10886-011-0017-2.
19. Ando T, Inomata S, Yamamoto M. Lepidopteran sex pheromones. In: Schulz S, editor. *The chemistry of pheromones and other semiochemicals I Top Curr Chem*. Berlin: Springer; 2004. pp. 51-96.
20. Costanzo K, Monteiro A. The use of chemical and visual cues in female choice in the butterfly *Bicyclus anynana*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2007;274: 845-851.
21. Osorio D, Vorobyev M. A review of the evolution of animal colour vision and visual communication signals. *Vision Research*. 2008;48: 2042-2051. doi: 10.1016/j.visres.2008.06.018.
22. Sarto iMV, Quero C, Santa-Cruz M, Rosell G, Guerrero A. Sexual communication in day-flying Lepidoptera with special reference to castniids or 'butterfly-moths'. *Bull Entomol Res*. 2016: 1-11.
23. Wadt L. Comportamento reprodutivo da broca gigante da cana-de-açúcar, *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae), como base para seu controle M. Sc. Thesis, Universidade de São Paulo. 2012. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-13032012-154821/>
24. Riolo P, Verdolini E, Anfora G, Minuz RL, Ruschioni S, Carlin S, et al. Perching mate-locating strategy in *Paysandisia archon* (Lepidoptera: Castniidae): behavioral and morpho-physiological investigations. *J Econ Entomol*. 2014;107: 1009-1021. doi: 10.1603/ec13298.
25. Frérot B, Delle-Vedove R, Beaudoin-Ollivier L, Zagatti P, Ducrot P, Grison C, et al. Fragrant legs in *Paysandisia archon* males (Lepidoptera: Castniidae). *Chemoecology*. 2013;23: 137-142. doi: 10.1007/s00049-013-0128-z.
26. Quero C, i Monteys VS, Rosell G, Puigmartí M, Guerrero A. Sexual communication in castniid moths: Males mark their territories and appear to bear all chemical burden. *PloS one*. 2017;12: e0171166.
27. Delle-Vedove R, Frérot B, Hossaert-McKey M, Beaudoin-Ollivier L. Courtship behavior of the castniid palm borer, *Paysandisia archon*: potential roles of male scents and visual cues in a day-flying moth. *J Insect Sci*. 2014;14: 1-14. doi: 10.1673/031.014.52.
28. Rebouças LMC, Caraciolo MdSB, Sant'Ana AEG, Pickett JA, Wadhams LJ, Pow EM. Composição química da glândula abdominal da fêmea da mariposa *Castnia licus* (Drury) (Lepidoptera: Castniidae): possíveis feromônios e precursores. *Quim Nova*. 1999;22: 645-648.

29. Butt BA, Cantu E. sex determination of lepidopterous pupae. Washington, USDA1962. 7 p.
30. Miller JY. Studies in the castniidae. Sarasota, Florida: the allyn museum of entomology; 1980.
31. Duckworth WD, Eichlin TD. A classification of the Sesiidae of America north of Mexico (Lepidoptera: Sesiioidea): State of California, Department of Food and Agriculture, Division of Plant Industry, Laboratory Services; 1977.
32. Ruschioni S, Riolo P, Verdolini E, Peri E, Guarino S, Colazza S, et al. Fine structure of antennal sensilla of *Paysandisia archon* and electrophysiological responses to volatile compounds associated with host palms. PloS one. 2015;10: e0124607. doi: 10.1371/journal.pone.0124607.
33. Leite LAR, Casagrande MM, Mielke OHH. External morphology of the adult of *Heraclides anchisiades capys* (Hübner, [1809]) (Lepidoptera: Papilionidae) I: head, cephalic appendages and cervical region. Braz Arch Biol Technol. 2010;53: 1119-1126.
34. Xiangqun Y, Ke G, Feng Y, Yalin Z. Ultrastructure of antennal sensilla of four skipper butterflies in *Parnara sp.* and *Pelopidas sp.* (Lepidoptera: Hesperidae). ZooKeys. 2014: 17-27. doi: 10.3897/zookeys.399.7063.
35. Van Der Pers JNC, Cuperus PL, Den Otter CJ. Distribution of sense organs on male antennae of small ermine moths, *Yponomeuta spp.* (Lepidoptera: Yponomeutidae). International Journal of Insect Morphology and Embryology. 1980;9: 15-23. doi: 10.1016/0020-7322(80)90032-X.
36. Castrejón GVR, Valdez-Carrasco J, Cibrian-Tovar J, Camino-Lavin M, Osorio R. Morphology and distribution of the sense organs on the antennae of *Copitarsia consueta* (Lepidoptera: Noctuidae). Fla Entomol. 1999;82: 546-555. doi: 10.2307/3496472.
37. Böröczky K, Wada-Katsumata A, Batchelor D, Zhukovskaya M, Schal C. Insects groom their antennae to enhance olfactory acuity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013;110: 3615-3620. doi: 10.1073/pnas.1212466110.
38. Leal WS. Pheromone reception. In: Schulz S, editor. The chemistry of pheromones and other semiochemicals II Top Curr Chem. Berlin: Springer; 2004. pp. 1-36.
39. Dolzer J, Fischer K, Stengl M. Adaptation in pheromone-sensitive trichoid sensilla of the hawkmoth *Manduca sexta*. J Exp Biol. 2003;206: 1575-1588.
40. Sanders WR. Sounds and smells of a subterranean sesiid: Acoustic detection and mating disruption of grape root borer M. Sc. Thesis, University of Florida. 2010. Available from: <http://ufdc.ufl.edu/UFE0042175/00001>
41. Shields VD, Hildebrand JG. Recent advances in insect olfaction, specifically regarding the morphology and sensory physiology of antennal sensilla of the female sphinx moth *Manduca sexta*. Microsc Res Techniq. 2001;55: 307-329.
42. Hillier NK, Kleineidam C, Vickers NJ. Physiology and glomerular projections of olfactory receptor neurons on the antenna of female *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) responsive to behaviorally relevant odors. J Comp Physiol A. 2006;192: 199-219. doi: DOI 10.1007/s00359-005-0061-x.

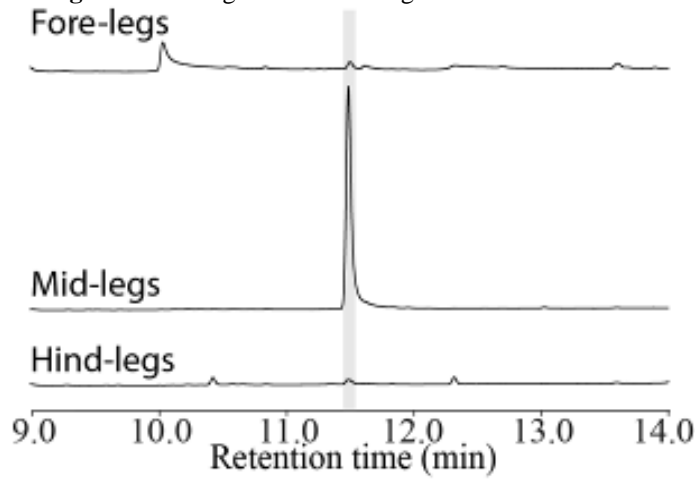
43. Zhang QH, Wu ZN, Zhou JJ, Du YJ. Molecular and functional characterization of a candidate sex pheromone receptor OR1 in *Spodoptera litura*. *Insect Sci.* 2017;24: 543-558.
44. Grant AJ, O'Connell RJ, Eisner T. Pheromone-mediated sexual selection in the moth *Utetheisa ornatrix*: Olfactory receptor neurons responsive to a male-produced pheromone. *J Insect Behav.* 1989;2: 371-385.
45. Mark CJ, Parsons S, Holwell GI. Antennal morphology and micro-sensory architecture of the New Zealand magpie moth, *Nyctemera annulata* (Lepidoptera: Erebidae): diversity, distribution and dimorphism. *Aust Entomol.* 2017;57: 303-323.
46. Pophof B. Olfactory responses recorded from sensilla coeloconica of the silkmoth *Bombyx mori*. *Physiol Entomol.* 1997;22: 239-248. doi: 10.1111/j.1365-3032.1997.tb01164.x.
47. Kristoffersen L, Hallberg E, Wallén R, Anderbrant O. Sparse sensillar array on *Trioza apicalis* (Homoptera: Triozidae) antennae an adaptation to high stimulus levels? *Arthropod Struct Dev.* 2006;35: 85-92.
48. Altner H, Prillinger L. Ultrastructure of invertebrate chemo-, thermo-, and hygroreceptors and its functional significance. *International Review of Cytology*: Elsevier; 1980. pp. 69-139.
49. Anderson P, Hallberg E, Subchev M. Morphology of antennal sensilla auricillica and their detection of plant volatiles in the Herald moth, *Scoliopteryx libatrix* L. (Lepidoptera: Noctuidae). *Arthropod Struct Dev.* 2000;29: 33-41. doi: 10.1016/S1467-8039(00)00011-6.
50. Larsson MC, Hallberg E, Kozlov MV, Francke W, Hansson BS, Löfstedt C. Specialized olfactory receptor neurons mediating intra-and interspecific chemical communication in leafminer moths *Eriocrania spp.*(Lepidoptera: Eriocraniidae). *J Exp Biol.* 2002;205: 989-998.
51. Percy-Cunningham JE, Macdonald JA. Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing glands In: Prestwich GD, Blomquist GJ, editors. *Pheromone biochemistry*. London: Academic Press; 1987. pp. 27-75.
52. Ma M, Chang M-M, Lu Y, Lei C-L, Yang F-L. Ultrastructure of sensilla of antennae and ovipositor of *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae), and location of female sex pheromone gland. *Scientific reports.* 2017;7: 40637.
53. Raina AK, Wergin WP, Murphy CA, Erbe EF. Structural organization of the sex pheromone gland in *Helicoverpa zea* in relation to pheromone production and release. *Arthropod Struct Dev.* 2000;29: 343-353.
54. Ma PW, Roelofs WL. Sex pheromone gland of the female European corn borer moth, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae): ultrastructural and biochemical evidences. *Zoolog Sci.* 2002;19: 501-511.
55. Birch MC, Poppy GM, Baker TC. Scents and eversible scent structures of male moths. *Annu Rev Entomol.* 1990;35: 25-54. doi: 10.1146/annurev.en.35.010190.000325.
56. Hernandez R, J. L., Bofill R, Dapporto L, Munguira ML, Vila R. Morphological and chemical analysis of male scent organs in the butterfly genus *Pyrgus* (Lepidoptera: Hesperiiidae). *Org Divers Evol.* 2014;14: 269-278. doi: 10.1007/s13127-014-0170-x.

57. Levi-Zada A, David M, Fefer D, Seplyarsky V, Sadowsky A, Dobrinin S, et al. Circadian release of male-specific components of the greater date moth, *Aphomia (arenipses) sabella*, using sequential SPME/GC/MS analysis. *J Chem Ecol.* 2014;40: 236-243. doi: 10.1007/s10886-014-0391-7.
58. Schulz S, Beccaloni G, Brown KS, Boppre M, Freitas AVL, Ockenfels P, et al. Semiochemicals derived from pyrrolizidine alkaloids in male ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae). *Biochem Syst Ecol.* 2004;32: 699-713. doi: 10.1016/j.bse.2003.12.004.
59. Jordan K. On the scent organs in the males of certain American Castniidae. *Novitates Zoologicae.* 1923;30: 159–162.
60. Girotti JR, Mijailovsky SJ, Juárez MP. Epicuticular hydrocarbons of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Physiol Entomol.* 2012;37: 266-277. doi: 10.1111/j.1365-3032.2012.00843.x.
61. Nishida R, Schulz S, Kim CS, Fukami H, Kuwahara Y, Honda K, et al. Male sex pheromone of a giant danaine butterfly, *Idea leuconoe*. *J Chem Ecol.* 1996;22: 949-972. doi: 10.1007/Bf02029947.
62. Mann F, Vanjari S, Rosser N, Mann S, Dasmahapatra KK, Corbin C, et al. The scent chemistry of *Heliconius* wing androconia. *J Chem Ecol.* 2017;43: 843-857.
63. Grant GG, Frech D, Macdonald L, Slessor KN, King GGS. Copulation releaser pheromone in body scales of female white marked tussock moth, *Orgyia leucostigma* (Lepidoptera, Lymantriidae): Identification and behavioral role. *J Chem Ecol.* 1987;13: 345-356. doi: 10.1007/Bf01025894.
64. Schulz S, Francke W, Boppre M. Carboxylic-acids from hairpencils of male *Amauris* Butterflies (Lepidoptera: Danainae). *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1988;369: 633-638. doi: 10.1515/bchm3.1988.369.2.633.
65. Schulz S, Boppré M, Vane-Wright R. Specific mixtures of secretions from male scent organs of African milkweed butterflies (Danainae). *Phil Trans R Soc Lond B.* 1993;342: 161-181.
66. Ômura H, Yanai N, Honda K. Sexual dimorphism in scent substances and cuticular lipids of adult *Papilio protenor* butterflies. *Z Naturforsch C.* 2012;67: 331-341.
67. Smith RJ, Guala E. Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. *J Invertebr Pathol.* 1982;39: 15-22.
68. Lundgren L, Bergström G. Wing scents and scent-released phases in the courtship behavior of *Lycaeides argyrognomon* (Lepidoptera: Lycaenidae). *J Chem Ecol.* 1975;1: 399-412.
69. Teal PEA, Tumlinson JH. Isolation, identification, and biosynthesis of compounds produced by male hairpencil glands of *Heliothis-Virescens* (F) (Lepidoptera: Noctuidae) *J Chem Ecol.* 1989;15: 413-427. doi: 10.1007/Bf02027801.
70. Costa DdL. Estudo químico e morfológico da broca-da-coroa-foliar *Eupalamides cyparissias* (Fabricius, 1776) (Lepidoptera: Castniidae) de areáceas Ph. D. Thesis, Universidade Federal de Alagoas. 2015. Available from: <http://www.repositorio.ufal.br/handle/riufal/1891>

71. Ômura H, Yotsuzuka S. Male-specific epicuticular compounds of the sulfur butterfly *Colias erate poliographus* (Lepidoptera: Pieridae). *Appl Entomol Zool.* 2015;50: 191-199.
72. Schwarz M, Klun J, Hart E, Leonhardt B, Weatherby J. Female sex pheromone of the yellow headed fireworm, *Acleris minuta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Environ Entomol.* 1983;12: 1253-1256.
73. EL-Sayed AM. The pherobase; 2018 [cited 2019 ]. Database: pheromones and semiochemicals [Internet]. Available from: <http://www.pherobase.com/>
74. Ando T. Number of species counted in the list of lepidopterous sex pheromones and attractants; 2018 [cited 2019 Jan 20]. Database: lepidopterous sex pheromones and attractants [Internet]. Available from: [https://lepipheromone.sakura.ne.jp/index\\_eng.html](https://lepipheromone.sakura.ne.jp/index_eng.html)
75. Mozūraitis R, Būda V. Intra-and interspecific activities of semiochemicals from the sex pheromone gland of the Welsh Clearwing, *Synanthedon Scoliaeformis*. *J Chem Ecol.* 2013;39: 1066-1069.
76. Mozūraitis R, Karalius V. Identification of minor sex pheromone components of the poplar clearwing moth *Paranthrene tabaniformis* (Lepidoptera: Sesiidae). *Z Naturforsch C.* 2007;62: 138-142.
77. Takács S, Gries G, Gries R. Communication ecology of webbing clothes moth: 4. Identification of male-and female-produced pheromones. *Chemoecology.* 2001;11: 153-159.
78. Löfstedt C, Wahlberg N, Millar J. Evolutionary patterns of pheromone diversity in Lepidoptera. In: Allison JD, Cardé RT, editors. *Pheromone communication in moths: evolution, behavior and application.* California: University of California Press; 2016. pp. 43-78.
79. Hillier NK, Vickers NJ. The role of heliothine hairpencil compounds in female *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) behavior and mate acceptance. *Chem Senses.* 2004;29: 499-511. doi: 10.1093/chemse/bjh052.

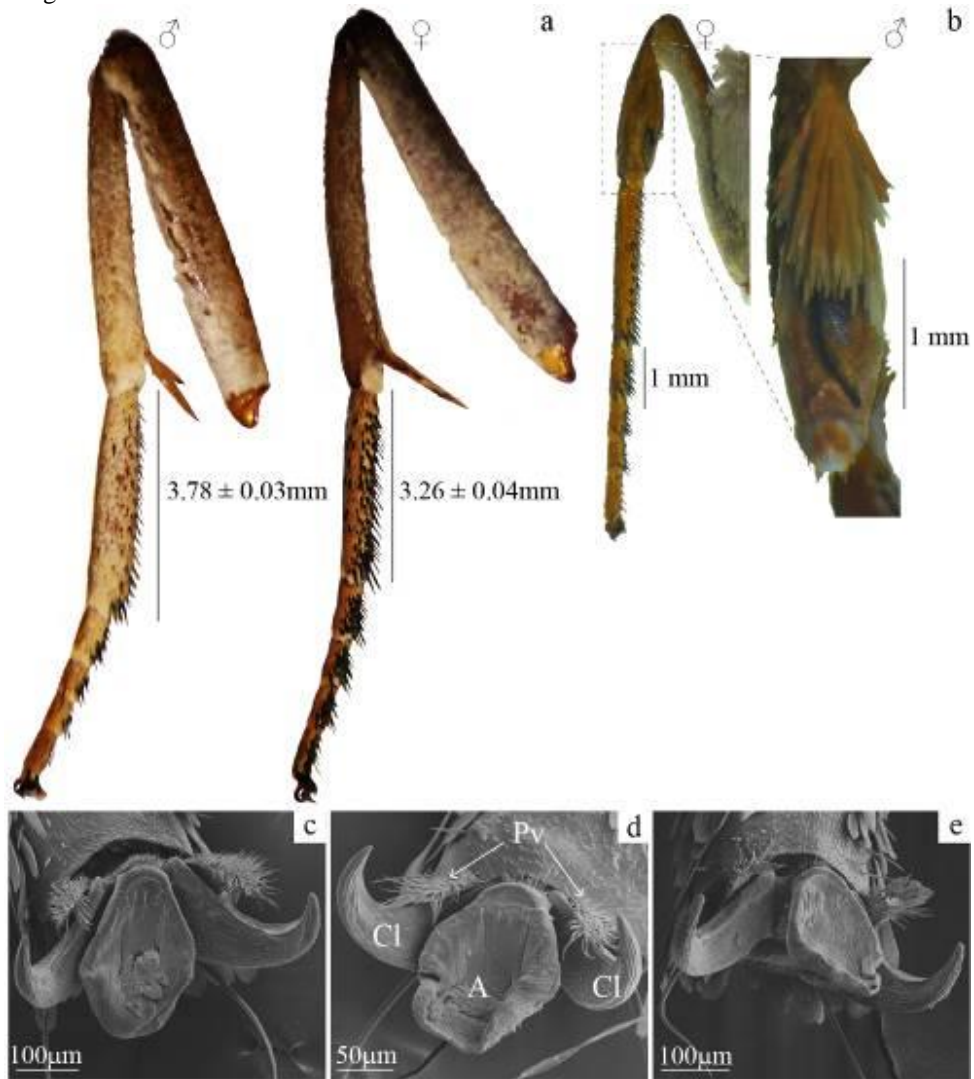
## 7. SUPPORTING INFORMATION

S1 Fig 8. Chromatograms of male legs *Telchin licus*.



GC-FID equipped with capillary column Rtx-5.

**S2 Fig 9.** Legs of *Telchin licus*.



(a) Comparison of sizes of mid-legs basitarsus in male and female. (b) Epiphyses of fore-leg. (c) Close-up of 5th tarsomere of (c) fore-leg, (d) mid-leg and (e) hind-leg showing arolium (A), claws (Cl) and pulvilli (Pv).

## CAPÍTULO II

**Componentes feromonais tipo II na glândula sexual de *Hyponomeuta taltula* (Schs., 1904) (Lepidoptera: Erebidae)**



## 1. RESUMO

A broca-peluda da cana-de-açúcar, *Hyponomeuta taltula* (Schaus, 1904) (Lepidoptera: Erebidae), ataca a cana-de-açúcar, cultura de grande importância econômica para o Brasil. Armadilhas com feromônios sexuais são ferramentas empregadas do Manejo Integrado de Pragas que fornecem uma abordagem alternativa para o monitoramento e controle da população de pragas. No entanto, a ausência de informação sobre a composição do feromônio sexual de *H. taltula* não tem permitido o uso desta tecnologia. Neste estudo elucidamos a composição do feromônio sexual de *H. taltula* mediante análises de cromatografia gasosa acoplada à eletroantenografia e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de extratos da glândula sexual. A mistura feromonal extraída das glândulas apresentou o (9*S*,10*R*)-epóxi-(*Z,Z*)-3,6-heneicosatrieno como componente majoritário e o (*Z,Z,Z*)-3,6,9-nonadecatrieno como componente minoritário na proporção 3:1, respectivamente. Adicionalmente, discutimos a função biológica e o efeito do (*Z,Z,Z*)-3,6,9-heneicosatrieno como um provável componente adicional do feromônio.

## 2. INTRODUÇÃO

A broca-peluda da cana-de-açúcar, *Hyponomeuta taltula* (Schaus, 1904) (Lepidoptera: Erebidae: Herminiinae) é uma praga que durante o seu desenvolvimento larval localiza-se na base das touceiras e danifica o sistema radicular da cana-de-açúcar.<sup>1-4</sup> Em plantas novas causa a morte da gema apical, e em plantas adultas, ocasiona perda de peso, brotação lateral e enraizamento aéreo.<sup>5</sup> Além disso, ocasiona danos indiretos decorrentes a entrada de fungos pelos orifícios ocasiona podridões, que resulta na redução do rendimento industrial no processo da fermentação alcoólica.<sup>6</sup>

O controle químico e manual são os métodos mais utilizados para a *H. taltula*.<sup>2;6</sup> No entanto, o hábito endofítico das brocas dificulta seu controle mediante o uso de inseticidas, já que estas permanecem no colmo ou nos rizomas e usualmente bloqueiam suas entradas com resíduos de seda e matéria orgânica, o que reduz o seu contato com o produto químico utilizado. De igual forma, a catação manual das lagartas é um método oneroso e pouco adequado.<sup>6</sup> Portanto, faz-se necessária a adoção de métodos de controle, como o comportamental, que é aplicado na fase adulta do inseto através o uso de armadilhas com feromônios.

Atualmente a subfamília Herminiinae é atraída para feromônios do tipo II. Este grupo de feromônios está constituído por derivados do ácido linoléico e linolênico, incluindo hidrocarbonetos poli-insaturados com cadeias lineares de 17 a 25 átomos de carbono, seus derivados mono ou diepóxidos e/ou com grupos funcionais carbonilados como cetonas, aldeídos e ésteres.<sup>7;8</sup>

Os estudos nos quais espécies de Herminiinae são relatadas, na maioria, referem-se ao uso de iscas com compostos atraentes pouco específicas, já que atraem também espécies diferentes além de herminiíneos.<sup>9;10</sup> Unicamente no estudo desenvolvido por Haynes et al. (1996), o feromônio sexual foi identificado em extratos glandulares da fêmea *Tetanolita mynesalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Erebididae) como a mistura de (Z,Z,Z)-3,6,9-heneicosatrieno (Z3,Z6,Z9-21:H) e (6S,7R)-epóxi-(Z,Z)-3,9-nonadecatrieno (Z3,epo6,Z9-19:H).

No norte da Flórida, ensaios de campo com o epóxido Z3,epo6,Z9-19:H atraíram *Renia salusalis* Walker, 1859 (Lepidoptera: Erebididae).<sup>12</sup> Este mesmo epóxido apresentou atratividade para a espécie *Zanclognatha* sp. no Vietnam.<sup>13</sup> De igual forma, os epóxidos de (Z,Z,Z)-3,6,9-eicosatrieno e Z3,Z6,Z9-21:H, principalmente na posição seis-sete foram atraentes para os herminiíneos *Idia americalis* (Guenée, 1854),<sup>14</sup> *Paracolax pryeri* (Butler, 1879),<sup>9</sup> *Bleptina caradrinalis* Guenée, 1852,<sup>15</sup> *Idia aemula* Hübner, 1821<sup>14</sup> e *T. mynesalis*.<sup>11</sup> Adicionalmente, Ando et al.(1995) observaram que machos de *Adrapsa notigera* (Butler, 1879) são atraídos para iscas pelos epóxidos Z3,epo6,Z9-22:H e Z3,epo6,Z9-23:H.

Dessa forma, é possível inferir que os machos de Herminiinae são atraídos por compostos de cadeias de 19 a 23 átomos de carbono com insaturações homoconjugadas nas posições três, seis e nove e seus correspondentes derivados mono epóxidos *cis*, principalmente na posição seis-sete.<sup>16</sup>

O presente trabalho descreve a identificação de componentes Tipo II atraentes no feromônio sexual produzido durante o comportamento de chamamento de fêmeas *H. taltula*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Insetos

Lagartas de *H. taltula* foram coletadas durante o período de 2015-2017 em culturas infestadas de cana-de-açúcar na Usina Triunfo Agroindustrial, localizada no município de

Boca da Mata (9°38'27,6" S; 36°13'12"O) e na Usina Santo Antônio localizada no município de São Luís de Quitunde (9°19'5.7"S; 35°33'39.2"O), ambas no estado de Alagoas. As lagartas foram individualizadas em placas de Petri e alimentadas com dieta artificial fornecida pelo laboratório de produção de *Cotesia flavipes* (Cam., 1891) (Hymenoptera: Braconidae) da Usina Triunfo, com composição relatada por Macedo et al. (2007). As lagartas permaneceram nesse recipiente até atingirem a fase pupal, na qual foram sexadas e mantidas em recipientes plásticos sobre papel filtro umedecido em gaiolas quadradas de 40 cm<sup>3</sup>. Os adultos emergidos foram coletados diariamente ao início da escotofase, alimentados com solução de mel 10% e destinados para cada experimento. A temperatura foi mantida a 27,2 ± 0,4 °C, umidade relativa de 81 ± 3% e fotoperíodo invertido de 14h fotofase e 10h escotofase.

A identificação e confirmação da espécie foi realizada pelo Dr. Sinval Silveira Neto, curador e taxonomista do museu de entomologia da ESALQ, Piracicaba, Brasil. A pesquisa desenvolvida em nosso laboratório tem o registro do SISGEN (A7D9828) e do CGEN (n.º 010428 / 2012-7), correspondendo ao acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional associado no Brasil.

### **3.2. Extração de compostos feromonais**

Os últimos segmentos abdominais foram extraídas de fêmeas virgens com um a quatro dias de idade no momento em que apresentaram comportamento de chamamento<sup>17</sup> e imersas em 100 µL de Hexano (grau HPLC, bidestilado). Após 30 minutos de contato com o solvente, o sobrenadante foi transferido e mantido em refrigeração (-20°C). Um total de 11 extratos, contendo de quatro a dez glândulas por extrato, foi obtido. Uma solução de tridecano 50 µg/mL foi usado como padrão interno.

### **3.3. Análises Cromatográficas**

Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa (GC) em um Cromatógrafo Shimadzu GC-2010 acoplado a um detector de ionização em chama (FID). A cromatografia foi realizada em coluna capilar Rtx-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm Restetek®). A temperatura do forno foi mantida à 50 °C por 5 minutos, com rampa de aquecimento de 10 °C/min até 160 °C e, posteriormente, 6 °C/min até 250 °C, mantendo a última temperatura por 10 minutos. O hidrogênio foi usado como gás de arrastre, com fluxo de 1,79 mL/min. A injeção de 1 µL dos extratos foi feita no modo splitless à 250 °C e a detecção nesta mesma temperatura. Adicionalmente uma coluna capilar Rt-β-DEXm (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm Restetek®) foi

usada nas seguintes condições: temperatura inicial 100 °C, temperatura final 200 °C com aquecimento de 5 °C/min, a temperatura final foi mantida por 40 min. Fluxo de Hidrogênio 1 mL/ min.

De igual forma, os extratos foram analisados em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu QP-2010 Ultra), equipado com coluna NST-5 (30 m x 0,25mm x 0,25µm NanoSeparationTechnology®) nas seguintes condições cromatográficas: 50°C por 5 minutos, posteriormente aquecimento de 10 °C/min até atingir 160°C e, em sequência, aquecimento de 6°C/min até 250°C. Foi injetado 1 µL de cada extrato em modo splitless à 250 °C com hélio como gás de arraste (1,8 mL/min). O espectrômetro de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) em modo de varredura entre 35 à 400 m/z. A fonte de íons se manteve constante a 200 °C e a interface a 250 °C. A identificação dos compostos foi feita pela comparação de seu espectro de massas e índice de Kovats com padrões sintéticos e/ou comparação com as bases de dados NITS e WILEY.

Cromatografia gasosa acoplada a eletroantografia (GC-EAD) foi usada para analisar a atividade eletroantegráfica dos extratos glandulares e padrões sintéticos (100 mg/L) frente a antenas de machos de um a dois dias de idade. Um cromatógrafo gasoso (Schimadzu, GC-2010) equipado com uma coluna Rtx-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm Restetek®) nas seguintes condições cromatográficas: 160 °C por 2 minutos, posteriormente aquecimento de 6°C/min até atingir 250°C. A injeção de 2 µL de extrato ou padrão foi feita no modo splitless à 250 °C usando hidrogênio como gás de arraste, com fluxo de 1,0 mL/min. O efluente da coluna foi dividido com um conector Y em duas ramificações de 0,25 mm-d.i., uma ramificação em direção ao detector de ionização de chama (FID) à 250 °C e a outra para uma linha de transferência aquecida (200 °C) com conexão ao capilar de vidro de liberação de estímulo. O efluente do capilar foi diluído com ar umidificado.

Antenas foram removidas de machos de um ou dois dias de idade previamente anestesiados a frio e os flagelômeros da região apical da antena foram cortados antes de colocá-la, nos eletrodos de prata com gel condutor Spectra 360 (Parker lab. Inc., Hellendoorn, Holanda). Posteriormente, foram posicionadas perpendicularmente ao fluxo de ar proveniente do capilar de liberação. A amplificação dos sinais elétricos foi feita em um amplificador de alta impedância (IDA-4, Syntech Hilversum, Holanda) e analisados utilizando o programa Syntech GC-EAD32 versão 4.6, 2008. Apenas uma das antenas do inseto foi usada para cada

ensaio. Um total de 10 ensaios com o extrato da glândula e com mistura de padrões foi realizado.

### 3.4. Eletroantenografia

Uma série de doses (0,05; 0,10; 0,50; 1,00 e 2,00 ng/dispensador) dos padrões de (Z,Z,Z)-3,6,9-nonadecatrieno (Z3Z6Z9-19:H) e (9S,10R)-epóxi-(Z,Z)-3,6-heneicosatrieno (Z3,Z6,epo9-21:H (9S,10)) foram usados para a realização das análises eletroantenográficas (EAG) em antenas de machos de um a dois dias de idade de *H. taltula* (a preparação da antena e o equipamento usado foram similares ao procedimento descrito para GC-EAD). Previamente ao registro do estímulo, 10 µL de cada dose ou hexano foram colocados em papel filtro dentro de uma pipeta de vidro. Após 1 min de evaporação do solvente (Hexano) uma corrente de ar umedecido (300 mL/min) gerado com um controlador de estímulo CS-01 (Syntech) foi passada através da pipeta com duração de 200 ms. Apenas uma das antenas do inseto foi usada para cada série. As médias de despolarização foram comparadas para significância usando ANOVA seguido pelo teste Tukey,  $p < 0,05$ . Cada dose foi testada cinco vezes em cada antena, com um intervalo de 30 s para recuperação da mesma, totalizando 10 repetições por antena, cinco para cada dose de padrão e cinco para o controle hexano, empregadas de forma alternada.

### 3.5. Testes de campo

Os testes de campo foram realizados no município de Boca da Mata, em plantações de cana-de-açúcar pertencentes à Usina Triunfo (9°40'47''S; 36°08'35''O). O primeiro teste foi de 14 a 18 de janeiro de 2019 com seis tratamentos: T1: controle, T2: Z3,Z6,Z9-19:H, T3: Z3,Z6-epo9-21:H (9S,10R), T4: Z3,Z6,Z9-21:H, T5: Z3,Z6,Z9-19:H + Z3,Z6-epo9-21:H (9S,10R) e T6: Z3,Z6,Z9-19:H + Z3,Z6-epo9-21:H (9S,10R) + Z3,Z6,Z9-21:H. O segundo teste foi de 21 a 25 de janeiro de 2019 com os tratamentos T5: Z3,Z6,Z9-19:H + Z3,Z6-epo9-21:H (9S,10R) e T6: Z3,Z6,Z9-19:H + Z3,Z6-epo9-21:H (9S,10R) + Z3,Z6,Z9-21:H. Uma quantidade de 100 µg de cada tratamento foi aplicado em septos de borracha (8 mm d. LBOR), que foram utilizados como dispensadores. Cada septo foi colocado no centro da base adesiva (30 cm × 30 cm) de uma armadilha tipo delta.

As armadilhas foram colocadas a aproximadamente 1,20 m acima do solo, penduradas em estacas de madeira e três repetições para cada tratamento foram testadas. No primeiro teste seis armadilhas (uma para cada tratamento) foram distribuídas randomicamente em um bloco

experimental em lotes da plantação de cana-de-açúcar com a maior incidência de *H. taltula* durante a safra 2018/2019. Em cada bloco as armadilhas foram disponibilizadas em duas linhas paralelas afastadas por 50 metros, onde em cada linha as armadilhas estavam separadas entre si por 50 metros. No segundo teste, cada armadilha foi distribuída em lotes com incidência de *H. taltula* distanciados ~5 Km.

Testes de semicampo em laboratório foram conduzidos em telado (3 m x 4 m) em condições ambientais durante 11 ao 15 de fevereiro de 2019. Uma armadilha delta contendo o T6 foi colocada numa lateral do telado e 10 adultos machos de um ou dois dias de idade de *H. taltula* foram liberados no interior do telado. A armadilha foi avaliada diariamente por cinco dias.

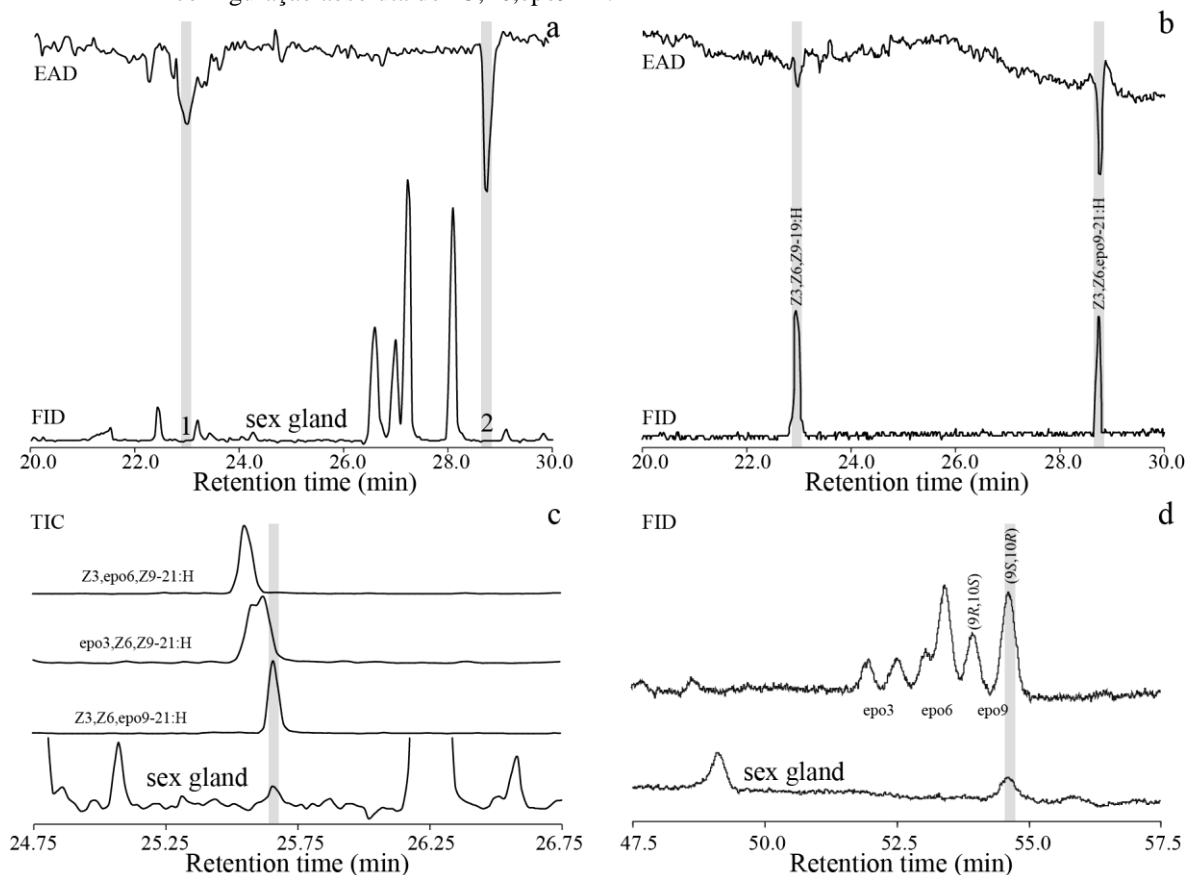
### 3.6. Padrões

O (Z,Z,Z)-3,6,9-heneicosatrieno e seus derivados monoepoxidados foram sintetizados no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais da Universidade Federal de Alagoas. O (9S,10R)-epoxi-(Z,Z)-3,6-heneicosadieno foi fornecido pelo Dr. Wittko Francke da Universidade de Hamburgo e o (Z,Z,Z)-3,6,9-nonadecatrieno foi fornecido pelo Dr. Christer Löfstedt da Universidade de Lund.

## 4. RESULTADOS

Extratos da glândula sexual de fêmeas de *H. taltula* apresentam três compostos com estrutura molecular de feromônios tipo II: Z3,Z6,Z9-19:H (KI 1872,  $0.09 \pm 0.07$  ng/♀), Z3,Z6,Z9-21:H (KI 2073,  $0.84 \pm 0.12$  ng/♀) e Z3,Z6,epo9-21:H (KI 2254,  $0.23 \pm 0.10$  ng/♀). Destes, unicamente Z3,Z6,Z9-19:H e Z3,Z6,epo9-21:H apresentaram respostas eletroantegráficas na antena de machos em análises de GC-EAG (Figura 1a,b). Os dois compostos ativos estão em proporção de 1:3 (relação de massa) nos extratos glandulares. O segundo composto ativo foi inicialmente identificado como Z3,Z6,epo9-21:H (Figura 1c). e posteriormente, confirmado por cromatografia gasosa com coluna quiral como Z3,Z6,epo9-21:H (9S,10R) (Figura 1d).

**Figura - 1** GC-EAD do extrato de glândulas e padrões sintéticos em antenas de macho de *Hyponeuma taltula* configuração absoluta do Z3,Z6,epo9-21:H



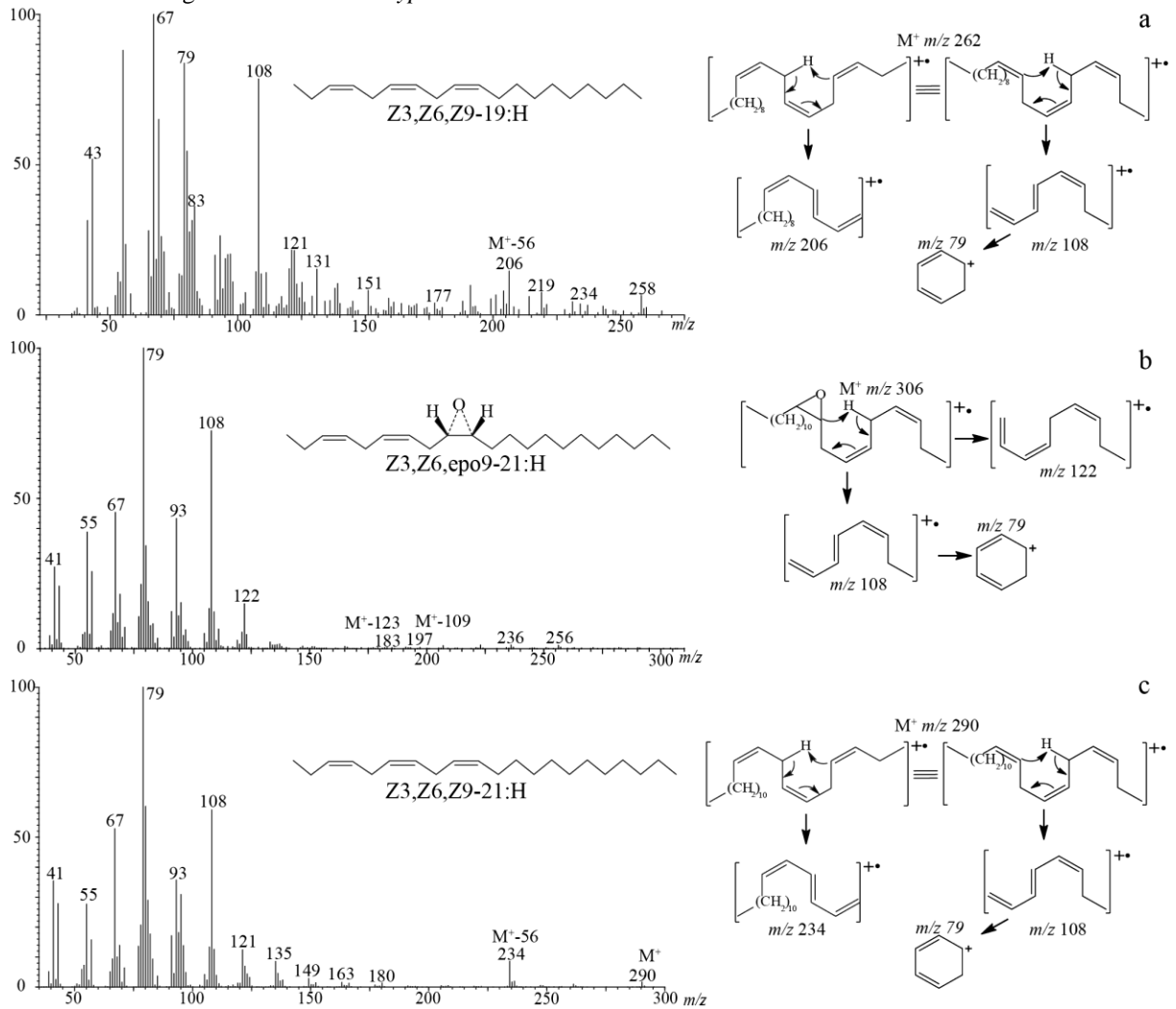
(a) Resposta eletroantenográfica de antena de macho para o extrato de glândula sexual. (b) Resposta eletroantenográfica de antena de macho para mistura dos padrões de Z3,Z6,Z9-19:H e Z3,Z6,epo9-21:H (9*S*,10*R*). (c) Comparação dos cromatogramas de íons totais dos padrões de monoepóxidos do Z3,Z6,Z9-21:H e extrato glandular em GC-MS equipado com coluna Rtx-1. (d) Comparação cromatogramas da mistura de monoepóxidos do Z3,Z6,Z9-21:H e extrato glandular em GC-FID equipado com coluna Rt- $\beta$ -DEXm.

O espectro de massa do Z3,Z6,Z9-19:H (Figura 2a) apresenta o íon  $[M^+ - 56]$   $m/z$  206 (15%) correspondente ao cátion radical  $[H(CH=CH)_3(CH_2)_8CH_3]^+$  produzido por rearranjo e clivagem heterolítica da ligação entre o C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub>, dando lugar a outra dupla ligação entre C<sub>9</sub> e C<sub>10</sub>. O íon  $m/z$  108 (78%) é devido ao fragmento  $[CH_3CH_2(CH=CH)_3H]^+$  pela clivagem da ligação entre C<sub>8</sub> e C<sub>9</sub> com transferência de hidrogênio.

O espectro de massa do Z3,Z6,epo9-21:H (Figura 2b) apresenta o íon  $m/z$  108 (72%) correspondente ao cátion radical  $[CH_3CH_2(CH=CH)_3H]^+$  produzido pela transferência de hidrogênio e clivagem da ligação entre o C<sub>8</sub> e C<sub>9</sub>, dando lugar a outra dupla ligação entre C<sub>5</sub> e C<sub>6</sub>. O cátion radical  $m/z$  122 (15%) é devido ao fragmento  $[CH_3(CH=CH)_3CH_2CH_3]^+$  dado pelo fragmentação no anel do epóxido. Os fragmentos  $[M^+ - 123]$   $m/z$  183 (0.4%) e  $[M^+ - 109]$   $m/z$  197 (0.4%) caracterizam o epóxido na posição nove.

O espectro de massa do Z3,Z6,Z9-21:H (Figura 2c) apresenta íon molecular  $[M^+]$   $m/z$  290 (2%) e o íon  $[M^+-56]$   $m/z$  234 (9%) correspondente ao  $[H(CH=CH)_3(CH_2)_{10}CH_3]^+$  produzido por rearranjo e clivagem da ligação entre o C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub>, dando lugar a uma outra dupla ligação entre C<sub>9</sub> e C<sub>10</sub>. O íon  $m/z$  108 (60%) é devido ao fragmento  $[CH_3CH_2(CH=CH)_3H]^+$  pela clivagem da ligação entre C<sub>8</sub> e C<sub>9</sub> com transferência de hidrogênio.

**Figura - 2** Espectro de massa do Z3,Z6,Z9-19:H, Z3,Z6,epo9-21:H e Z3,Z6,Z9-21:H presentes no extrato da glândula sexual de *Hyponomeuta taltula*

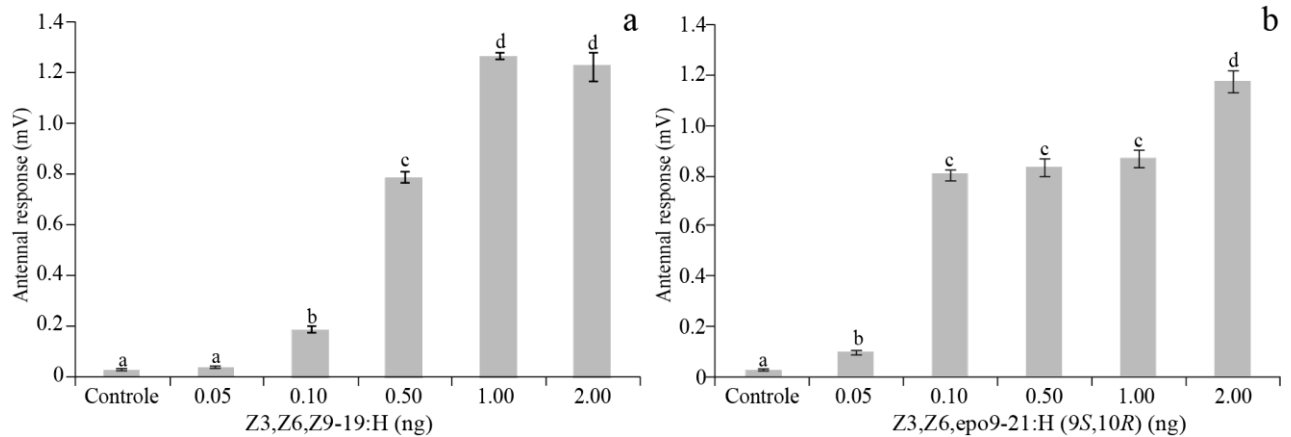


(a) Espectro de massa e mecanismo de fragmentação do Z3,Z6,Z9-19:H. (b) Espectro de massa e mecanismo de fragmentação do Z3,Z6,epo9-21:H. (c) Espectro de massa e mecanismo de fragmentação do Z3,Z6,Z9-21:H.

As antenas dos adultos machos de *H. taltula* mostraram respostas eletrofisiológicas aos dois componentes sintéticos do feromônio testados individualmente (Figura 3). Os componentes do feromônio sexual individualmente desencadearam maior atividade eletroantenoográfica que a do controle (hexano) em todas as doses testadas, excetuando-se na dose de 0,05 ng para o Z3,Z6,Z9-19:H (teste de Tukey  $p < 0,05$ ,  $N = 5$ ).



**Figura - 3** Respostas eletroantegráficas para diferentes dosagens de Z3,Z6,Z9-19:H e Z3,Z6,epo9-21:H (9S,10R) em antenas de macho de *Hyponeuma taltula*



Média ( $\pm$  EPM) de respostas eletroantegráficas em antenas de macho de *H. taltula*. (a) Z3,Z6,Z9-19:H. (b) Z3,Z6,epo9-21:H. Letras diferentes representam a diferença entre as dosagens ( $p < 0,05$ ; teste ANOVA, Tukey, N=5).

Durante os testes de campo unicamente um inseto foi capturado no tratamento 4 da mistura ternária de Z3,Z6,Z9-19H, Z3,Z6,epo9-21:H (9S,10R) e Z3,Z6,Z9-21:H e no teste de semicampo nenhum inseto foi capturado.

## 5. DISCUSÃO

A composição do feromônio sexual da *H. taltula* foi proposta como a mistura de Z3,Z6,Z9-19:H e Z3,Z6,epo9-21:H (9S,10R) numa relação de 1:3, respectivamente. Adicionalmente a glândula sexual contém Z3,Z6,Z9-21:H, o qual é um composto que faz parte do feromônio sexual de muitas mariposas da família Erebidae, Geometridae e Noctuidae,<sup>18-20</sup> incluído a mariposa *T. mynesalis*<sup>11</sup> da mesma subfamília da *H. taltula* (Herminiinae). Ainda, que o Z3,Z6,Z9-21:H não apresentou uma resposta eletroantegráfica nas antenas dos machos, este composto não pode ser desconsiderado no feromônio sexual, pois diversos estudos demonstram que os feromônios tipo II apresentam respostas eletroantegráficas fracas,<sup>21</sup> ou inexistentes.<sup>22</sup> No entanto, a presença destes hidrocarbonetos de cadeia longa na mistura feromonal podem ser indispensáveis para manter a atratividade em estudos de campo, como é relatado para a *Dioryctria mendacella* (Staudinger 1859) (Lepidoptera: Pyralidae).<sup>22</sup>

O Z3,Z6,Z9-19:H é um composto feromonal presente em espécies das famílias Geometridae, Noctuidae<sup>23</sup> e na *Lymantria mathura* Moore, 1865 (Lepidoptera: Erebidae).<sup>24</sup> Usualmente, as misturas feromonais que contém este hidrocarboneto adicionalmente possuem

seus derivados monoepoxidados na posição seis-sete com configuração 6S,7R.<sup>25-29</sup> Por outro lado, o Z3,Z6,Z9-19:H também pode estar acompanhado por hidrocarbonetos insaturados com cadeias de átomos de carbono maior como C<sub>20</sub> e C<sub>21</sub>,<sup>19;29</sup> como observado no presente estudo com *H. taltula*.

O Z3,Z6,Z9-21:H serve como base para a biossíntese de epoxidienos,<sup>30</sup> como o Z3,Z6,epo9-21:H, composto do tipo II também presente em *H. taltula*. Este epoxidieno foi identificado pelos característicos íons fragmentos *m/z* 108, 183, e 197. Ainda que o Z3,Z6,epo9-19:H apresenta mesmo padrão de fragmentação,<sup>10</sup> o Z3,Z6,epo9-21:H pode ser diferenciado pelo seu maior tempo de retenção. Para o Z3,Z6,epo9-19:H reporta-se KI ~ 2050 (em coluna DB-5) e para o Z3,Z6,epo9-21:H ~ 2260 (em coluna DB-5)<sup>31</sup> correlacionando-se com KI observado 2254 (em coluna Rtx-5) neste estudo.

As estruturas químicas dos compostos presentes no feromônio exibem similaridade entre espécies relacionadas taxonomicamente.<sup>8</sup> A *H. taltula* possui compostos similares aos reportados na subfamília Herminiinae; cadeias C<sub>19</sub> e C<sub>21</sub> com uma ou duas insaturações e epóxidos como compostos atraentes feromonais.<sup>10</sup> Entretanto, a posição seis-sete do monoepóxido de Z3,Z6,Z9-21:H é a mais observada.<sup>11;15;16</sup> No obstante, algumas espécies da família Erebidae, como *Syllectra erycata* Stoll, 1780<sup>32</sup> e *Hypena sp.*,<sup>13;14</sup> que possuem o Z3,Z6,epo9-21:H como atraente masculino ou como feromônio feminino, e algumas especificamente com a configuração absoluta 9S,10R,<sup>32</sup> como observado em *H. taltula*.

A estereoquímica do epóxido é uma característica importante para a bioatividade do composto como feromônio sexual.<sup>10</sup> Um enantiômero pode ser altamente atraente, enquanto o outro pode ser fortemente antagonista,<sup>33</sup> como acontece na mariposa-cigana *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Erebidae) na qual o enantiômero (7R,8S) de seu feromônio sexual (Me2,epo7-20:H) é bioativo e o enantiômero oposto inibe a resposta feromonal.<sup>34</sup> Ou a mistura não-racêmica dos dois enantiômeros é bioativa, mas cada enantiômero individualmente é inativo como acontece em *S. erycata*.<sup>32</sup>

O mesmo monoepóxido de *H. taltula* (Z3,Z6,epo9-21:H) foi atraente em estudo de campo para a *Eupithecia assimilata* (Doubleday, 1856) (Lepidoptera: Geometridae) quando usado o enantiômero (9S, 10R), mas o enantiômero (9R, 10S) ou a mistura racêmica não apresentaram atratividade.<sup>35</sup> De igual forma, o uso de Z3,Z6,Z9-21:H na proporção presente nos extratos da glândula reduziu significativamente a atratividade do epoxidieno.<sup>35</sup>

Uma mistura semelhante de Z3,Z6,Z9-21:H e Z3,Z6,epo9-21:H foi relatada para os feromônios sexuais de mariposas da família Erebidae como *Caenurgina distincta* Neumoegen, 1883, *Euclidia cuspidea* Hübner, 1818,<sup>36</sup> e *Tyria jacobaeae* Linneo, 1758,<sup>37</sup> além de *Eupithecia annulata* (Hulst, 1896) (Lepidoptera: Geometridae)<sup>36</sup> e *Mocis megas* (Guenée, 1852) (Lepidoptera: Noctuidae).<sup>38</sup>

Diante os resultados do estudo de campo, diferentes variáveis podem estar influenciando a atratividade da mistura proposta: A mistura feromonal proposta pode não estar completa e outros componentes importantes para a atratividade precisam ainda ser identificados. Além disso, a proporção entre os compostos (1:3) determinada no extrato obtido pela extração da glândula sexual com solvente pode não representar corretamente a proporção liberada pelo inseto. Métodos de aeração são necessários para determinar com maior acuidade a proporção dos compostos liberados.<sup>39</sup> A dose usada (100 µg) pode não ter sido suficiente para o teste de campo. A dose dos componentes feromonais afetaria a taxa de emissão e o tempo de duração dos compostos na isca, que são importantes para as capturas masculinas. Taxa de emissão muito alta ou densidade de captura muito alta diminuirá as capturas, devido ao efeito de interferência entre as armadilhas.<sup>40</sup> No entanto, esta mesma dose com feromônios tipo II tem sido atraente para machos Erebidae.<sup>11</sup>

Em conclusão compostos feromonais de mariposas tipo II foram encontrados na glândula sexual de *H. taltula*. Os compostos Z3,Z6,Z9-19:H e Z3,Z6,epo9-21:H (9S,10R) numa relação de 1:3 apresentaram atividade eletroantegráfica nas antenas de machos. A presença de Z3,Z6,Z9-19:H e Z3,Z6,epo9-21:H (9S,10R) nas famílias Geometridae, Erebidae e Noctuidae como feromônio tipo II, reflete uma relação quimiosistemática que permite inferir estes dois compostos como componentes do feromônio sexual da *H. taltula*, apesar da necessidade de estudos químicos posteriores para confirmar se estes são de fato os únicos componentes atrativos da mistura feromonal. O Z3,Z6,Z9-21:H é um composto feromonal tipo II que pode funcionar como potenciador de atratividade ou como antagonista do feromônio sexual em diversas espécies de mariposas, no entanto a função biológica em *H. taltula* ainda não é conhecida e estudos de atratividade em campo devem ser conduzidos com mais detalhes para este fim. Ainda que a captura de insetos não foi bem sucedida, este trabalho reporta dados pertinentes na área da ecologia química de *H. taltula*.

## 6. REFÊRENCIAS

1. GUAGLIUMI, P. Situação das cigarrinhas e das brocas nos canaviais do estado de Santa Catarina e descobrimento de uma nova praga da cana [*Saccharum spp*, Brasil]. **Brasil Acucareiro**, v. 81, n. 3, p. 10-3, 1973.
2. MACEDO, D. **Broca-peluda *Hyponeuma taltula***. Maracaju, MG 2005.
3. MACEDO, D.; MACEDO, N. Aspectos da biologia de *Hyponeuma taltula* (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. In: Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açúcareiros e Alcooleiros do Brasil. Maceió-AL, BrazilQ Gráfica March - April 2007, 2007. p. 44-6.
4. MORAES, G. C.; ÁVILA, C. J. **Insetos-praga associados ao solo na cultura da cana-de-açúcar, no Estado de Mato Grosso do Sul**. Dourados, MS; 2014. p 37.
5. GARCIA, J. F. **Manual de identificação de pragas da Cana**. São Paulo, Brazil: p. 220. 2013. "Disponível em: < [https://www.fmcagricola.com.br/portal/manuais/pragas\\_cana/](https://www.fmcagricola.com.br/portal/manuais/pragas_cana/) >. Acesso em: 30 Dez 2018.
6. DARIO, G. J. A.; DARIO, I. S. N.; VALLE, F. N. D. et al. Ocorrência das brocas gigante (*Castia licus drury*) e peluda (*Hyponeuma taltula schaus*, 1904) em canaviais do nordeste e o controle com o inseticida tiametoxam + clorantropilprole. In: XXV Congresso Brasileiro de Entomologia. Campo Verde. Resumo. 2014.
7. LÖFSTEDT, C.; WAHLBERG, N.; MILLAR, J. Evolutionary patterns of pheromone diversity in Lepidoptera. Allison JD, Cardé RT (Ed.). In: **Pheromone communication in moths: evolution, behavior and application**. California: University of California Press, 2016 p. 43-78.
8. ANDO, T.; INOMATA, S.; YAMAMOTO, M. Lepidopteran sex pheromones. Schulz S (Ed.). In: **The chemistry of pheromones and other semiochemicals I Top Curr Chem**. Berlin: Springer, 2004. v. 239, p. 51-96.
9. ANDO, T.; OHSAWA, H.; UENO, T. et al. Hydrocarbons with a homoconjugated polyene system and their monoepoxy derivatives - sex attractants of geometrid and noctuid moths distributed in Japan **J Chem Ecol**, v. 19, n. 4, p. 787-98, 1993.
10. MILLAR, J. G. Polyene hydrocarbons and epoxides: A second major class of lepidopteran sex attractant pheromones. **Annu Rev Entomol**, v. 45, p. 575-604, 2000.
11. HAYNES, K. F.; YEARGAN, K. V.; MILLAR, J. G. et al. Identification of sex pheromone of *Tetanolita mynesalis* (Lepidoptera: Noctuidae), a prey species of bolas spider, *Mastophora hutchinsoni*. **J Chem Ecol**, v. 22, n. 1, p. 75-89, 1996.
12. LANDOLT, P. J.; TOTH, M.; FRANCKE, W. et al. Attraction of moths (Lepidoptera: Arctiidae, Geometridae, Noctuidae) to enantiomers of several epoxydienes. **Fla Entomol**, v. 79, n. 3, p. 392-7, 1996.
13. VAN HAI, T.; VAN VANG, L.; SON, P. K. et al. Sex attractants for moths of Vietnam: Field attraction by synthetic lures baited with known lepidopteran pheromones. **J Chem Ecol**, v. 28, n. 7, p. 1473-81, 2002.
14. WONG, J. W.; UNDERHILL, E. W.; MACKENZIE, S. L. et al. Sex attractants for geometrid and noctuid moths - field trapping and electroantennographic responses to triene hydrocarbons and monoepoxydiene derivatives **J Chem Ecol**, v. 11, n. 6, p. 727-56, 1985.

15. MILLAR, J. G.; GIBLIN, M.; BARTON, D. et al. Chiral lepidopteran sex attractants - blends of optically-active c20 and c21 diene epoxides as sex attractants for geometrid and noctuid moths (Lepidoptera) **Environ Entomol**, v. 20, n. 2, p. 450-7, 1991.
16. ANDO, T.; KISHI, H.; AKASHIO, N. et al. Sex attractants of geometrid and noctuid moths - chemical characterization and field-test of monoepoxides of 6,9-dienes and related-compounds. **J Chem Ecol**, v. 21, n. 3, p. 299-311, 1995.
17. TRIANA, M. F. **Ecologia Química da Broca-peluda da cana-de-açúcar, *Hyponeuma talrula* Schaus, 1904 (Lepidoptera: Erebidae: Herminiinae)**. 2015. 108 f. Mestre - Química e Biotecnologia Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Brasil.
18. SCHNEIDER, D.; SCHULZ, S.; KITTMANN, R. et al. Pheromones and glandular structures of both sexes of the weed-defoliator moth *Pareuchaetes pseudoinsulata* Rego Barros (Lep, Arctiidae). **J Appl Entomol**, v. 113, n. 3, p. 280-94, 1992.
19. WALKER, P. W.; ALLEN, G. R.; DAVIES, N. W. et al. Identification, synthesis and field testing of (3Z,6Z,9Z)-3,6,9-henicosatriene, a second bioactive component of the sex pheromone of the autumn gum moth, *Mnesampela privata*. **J Chem Ecol**, v. 35, n. 12, p. 1411-22, 2009.
20. JYOTHI, K. N.; PRASUNA, A. L.; PRASAD, A. R. Evidence for presence of female produced pheromone components in male scent brush extract of castor semi-looper moth *Achaea janata* L. **Indian journal of experimental biology**, v. 43, n. 4, p. 335-41, 2005.
21. LEAL, W. S. Pheromone reception. Schulz S (Ed.). In: **The chemistry of pheromones and other semiochemicals II Top Curr Chem**. Berlin: Springer, 2004. v. 240, p. 1-36.
22. HALL, D. R.; FARMAN, D.; DOMÍNGUEZ, J. C. et al. Female sex pheromone of the cone moth, *Dioryctria mendacella*: investigation of synergism between type I and type II pheromone components. **J Chem Ecol**, v. 43, n. 5, p. 433, 2017.
23. EL-SAYED, A. M. The pherobase. 2018. "Disponível em: < <http://www.pherobase.com/> >. Acesso em: 2019
24. OLIVER, J. E.; DICKENS, J. C.; ZLOTINA, M. et al. Sex attractant of the rosy Russian gypsy moth (*Lymantria mathura* Moore). **Z Naturforsch C**, v. 54, n. 5-6, p. 387-94, 1999.
25. SZOCS, G.; TOTH, M.; FRANCKE, W. et al. Species discrimination in five species of winter-flying geometrids (Lepidoptera) based on chirality of semiochemicals and flight season. **J Chem Ecol**, v. 19, n. 11, p. 2721-35, 1993.
26. YAMAMOTO, M.; KISO, M.; YAMAZAWA, H. et al. Identification of chiral sex pheromone secreted by giant geometrid moth, *Biston robustum* Butler. **J Chem Ecol**, v. 26, n. 11, p. 2579-90, 2000.
27. HANSSON, B. S.; SZÖCS, G.; SCHMIDT, F. et al. Electrophysiological and chemical analysis of sex pheromone communication system of the mottled umber, *Erannis defoliaria* (Lepidoptera: Geometridae). **J Chem Ecol**, v. 16, n. 6, p. 1887-97, 1990.
28. MILLAR, J. G.; GIBLIN, M.; BARTON, D. et al. (3Z,6Z,9Z)-Nonadecatriene and enantiomers of (3Z,9Z)-cis-6,7-Epoxy-nonadecadiene as sex attractants for two geometrid and one noctuid moth species. **J Chem Ecol**, v. 16, n. 7, p. 2153-66, 1990.
29. MILLAR, J. G.; GIBLIN, M.; BARTON, D. et al. 3Z,6Z,9Z-Trienes and unsaturated epoxides as sex attractants for geometrid moths. **J Chem Ecol**, v. 16, n. 7, p. 2307-16, 1990.

30. WEI, W.; MIYAMOTO, T.; ENDO, M. et al. Polyunsaturated hydrocarbons in the hemolymph: biosynthetic precursors of epoxy pheromones of geometrid and arctiid moths. **Insect Biochem Molec**, v. 33, n. 4, p. 397-405, 2003.
31. GIBB, A. R.; COMESKEY, D.; BERNDT, L. et al. Identification of sex pheromone components of a New Zealand geometrid moth, the common forest looper *Pseudocoremia suavis*, reveals a possible species complex. **J Chem Ecol**, v. 32, n. 4, p. 865-79, 2006.
32. RENO, M.; LALANNECASSOU, B.; DORE, J. C. et al. Electroantennographic analysis of sex-pheromone specificity in neotropical catocalinae (Lepidoptera, Noctuidae) - a multivariate approach. **J Insect Physiol**, v. 34, n. 6, p. 481-8, 1988.
33. MILLAR, J. G.; GIBLIN, M.; BARTON, D. et al. Synthesis and field screening of chiral monounsaturated epoxides as lepidopteran sex attractants and sex-pheromone components **J Chem Ecol**, v. 17, n. 5, p. 911-29, 1991.
34. MORI, K. Significance of chirality in pheromone science. **Bioorgan Med Chem**, v. 15, n. 24, p. 7505-23, 2007.
35. CAMPBELL, C. A. M.; TREGIDGA, E. L.; HALL, D. R. et al. Components of the sex pheromone of the currant pug moth, *Eupithecia assimolata*, a re-emergent hop pest in UK. **Entomol Exp Appl**, v. 122, n. 3, p. 265-9, 2007.
36. MILLAR, J. G.; GIBLIN, M.; BARTON, D. et al. Sex attractants and sex-pheromone components of noctuid moths *Euclidea cuspeida*, *Caenurgina distincta*, and geometrid moth *Eupithecia annulata*. **J Chem Ecol**, v. 17, n. 11, p. 2095-111, 1991.
37. FRÉROT, B.; M., R.; C., M. et al. Isolement et identification de composés à activité phéromonale chez les femelles de l'arctiide *Tyria jacobaeae*: Détermination biologique de la configuration absolue du composé majoritaire. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 46, n. 3, p. 281-9, 1988.
38. DESCOINS, C.; MALOSSE, C.; RENO, M. et al. Chemical-analysis of the pheromone blends produced by males and females of the neotropical moth, *Mocis-megas* (Guenee) (Lepidoptera, Noctuidae, Catocalinae). **Experientia**, v. 46, n. 5, p. 536-9, 1990.
39. MILLAR, J. The devil is in the details. **J Chem Ecol**, v. 40, n. 6, p. 517-8, 2014.
40. KNUTSON, A. E.; HARRIS, M. K.; MILLAR, J. G. Effects of pheromone dose, lure age, and trap design on capture of male pecan nut casebearer (Lepidoptera: Pyralidae) in pheromone-baited traps. **J Econ Entomol**, v. 91, n. 3, p. 715-22, 1998.

### CAPITULO III

**Aspectos da comunicação química intraespecífica da *Hypsipyla ferrealis* (Lepidoptera: Pyralidae): Estudos preliminares da composição do feromônio sexual e descrições morfológicas da antena e da glândula sexual**

## 1. RESUMO

A espécie *Hypsipyla ferrealis* Hampson, 1929 (Lepidoptera: Pyralidae) é praga das sementes da andiroba *Carapa guianensis* Aub. Os danos causados pelas lagartas desta espécie afetam a germinação da andiroba e o potencial de produção de óleo extraído das sementes. Considerando ausência de informação sobre a comunicação química intraespecífica desta espécie, nós descrevemos morfológicamente a antena e suas sensilas com o objetivo de elucidar seu papel olfativo e realizamos estudos morfológicos e histológicos na glândula sexual feminina responsável pela liberação do feromônio sexual. As antenas filiformes de *H. ferrealis* apresentam dimorfismo sexual na morfologia das sensilas tricoide, caética, estilocônica, coelocônica e auricíllica, sendo o macho com maior área olfativa. Por outro lado a glândula sexual da fêmea se localiza dorsolateralmente na membrana intersegmental entre o oitavo e nono segmento abdominal. Complementarmente propomos o (Z,E)-9,12-tetradecadienol e (E)-12-tetradecenol como componentes do feromônio sexual feminino da *H. ferrealis*.

## 2. INTRODUÇÃO

A *Hypsipyla ferrealis* Hampson, 1929 (Lepidoptera: Pyralidae) é praga das sementes da andiroba *Carapa guianensis* (Aublet, 1776) (Meliaceae). As lagartas desta espécie se alimentam dos cotilédones das sementes, ocasionando perdas do endosperma.<sup>1</sup> No final da fase larval, constroem uma câmara pupal no qual permanecem até a emergência do adulto.<sup>1;2</sup>

Como consequência, infestação de *H. ferrealis* em sementes registram porcentagem de predação entre 40 e 60%<sup>3;4</sup> e, aproximadamente, 40% de perdas na produção total de sementes.<sup>2</sup> Estes danos afetam a germinação da andiroba e o potencial de produção de óleo extraído das sementes. A extração de óleo das sementes de andiroba é uma importante atividade econômica das comunidades locais,<sup>5</sup> devido ao alto valor farmacêutico deste óleo.<sup>6-8</sup>

No gênero *Hypsipyla*, as espécies mais estudadas são *Hypsipyla robusta* (Moore, [1886]) distribuída pelas áreas tropicais e subtropicais da Ásia e da África, e *Hypsipyla grandella* (Zeller, 1848), presente em áreas tropicais da América. As duas são importantes pragas de muitas espécies de Meliaceae, tais como mogno brasileiro *Swietenia macrophylla* King, 1886 e cedro *Cedrela* sp. A biologia, ecologia e algumas tentativas de controle destas duas espécies têm sido estudadas e compiladas.<sup>9</sup> Por outro lado, aspectos da biologia,<sup>10;11</sup>



relatos de ocorrência no Brasil<sup>12-14</sup> e estudos de predação das sementes de andiroba<sup>1-3;15;16</sup> compreendem todo o conhecimento atual sobre *H. ferrealis*.

Quanto a estudos relacionados à comunicação química destas espécies, o feromônio sexual de *H. grandella* foi descrito como uma mistura de (*Z*)-9-tetradecenol (*Z*9-14:OH), (*Z,E*)-9,12-teradecadienol (*Z*9,*E*12-14:OH) e seus respectivos acetatos.<sup>17;18</sup> As proporções destes compostos variam dependendo da técnica usada para a sua determinação,<sup>19</sup> mas os dois alcoóis são os compostos majoritários da mistura. Além disso, o feromônio sexual de *H. robusta* tem apresentado variabilidade geográfica. Um estudo realizado na África determinou o feromônio sexual como uma mistura de acetato de (*Z,E*)-9,12-teradecadienila (*Z*9,*E*12-14:OAc), acetato de (*Z*)-9-tetradecenila (*Z*9-14:OAc) e acetato de (*Z*)-11-hexadecenila (*Z*11-16:OAc) em proporções de 5:3:2.<sup>20</sup> No entanto, esta mistura feromonal não apresentou capturas de machos na China, Malásia e Austrália, de modo que uma nova mistura foi proposta com os mesmos componentes e o *Z*9-14:OH adicional. Este último apresentou atividade eletroantegráfica e permitiu a captura de machos em testes realizados na China.<sup>21</sup>

O mecanismo de liberação e percepção destes feromônios no gênero *Hypsipyla*, ainda, é desconhecido. Sendo assim, este trabalho vem a contribuir com estudos morfológicos no entendimento da liberação do feromônio sexual das fêmeas e na descrição do sistema olfativo da *H. ferrealis*, além de investigar os compostos que possam atuar como possíveis componentes feromonais de *H. ferrealis*.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Insetos**

Lagartas de *H. ferrealis* foram obtidas de sementes de andiroba coletadas no município de Mazagão, AP, Brasil (00° 06' 54" S, 51° 17' 22" O) durante os meses de Junho e Julho de 2016 e 2017. Aproximadamente 70 sementes foram colocadas em bandejas e umedecidas diariamente até observar a formação de pupas. As pupas foram separada por sexo<sup>22</sup> e mantidas em gaiolas em separado (32 cm x 32 cm x 32 cm) até os adultos emergirem. Os adultos foram alimentados com solução de mel a 10% e destinados para cada experimento. A temperatura foi mantida a  $27.2 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $81 \pm 3\%$  e fotoperíodo invertido de 14h fotofase.

A identificação e confirmação da espécie foi realizada pelo Dr. Sinval Silveira Neto curador e taxonomista do museu de entomologia da ESALQ, Brasil. A pesquisa desenvolvida

em no laboratório de recursos naturais da Universidade Federal de Alagoas tem o registro do SISGEN (AA7CF44) e do CGEN (n.º 010428 / 2012-7), correspondendo ao acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional associado no Brasil.

### **3.2. Morfologia das antenas e ovipositor**

Imagens de microscopia eletrônica de varredura foram usadas para caracterizar as sensilas presentes nas antenas de ambos os sexos, assim como para realizar observações do ovipositor de *H. ferealis*. As antenas de ambos os sexos e os últimos segmentos do abdômen da fêmea foram removidos de insetos de um a dois dias de idade previamente anestesiados em frio (-20 °C). Imediatamente após a remoção, estes foram imersos em solução de glutaraldeído a 2% em solução tampão de fosfato (0.1 M pH 7) por cinco minutos e, posteriormente, foram desidratados numa série gradiente de etanol (50%, 70%, 80% e 90%, em cada 10min.). Foram metalizadas com alvo de ouro a 10 mA durante oito minutos. Antenas e ovipositor foram observados usando um microscópio eletrônico de varredura (Tescan Vega3 LM) a 20 kV. Um total de 9 antenas de cada sexo e 3 ovipositores foram usados.

### **3.3. Histologia do ovipositor**

Microscopia de luz foi usada para estudar os tecidos biológicos da membrana intersegmental entre o 8º e 9º segmento abdominal, nos quais é usualmente localizada a glândula feromonal em mariposas. Após as fêmeas serem anestesiadas ao frio, os últimos segmentos do abdômen foram extraídos e colocados em solução fixadora de Bouin (ácido pícrico, ácido acético glacial e formaldeído 40%) por 24h à temperatura ambiente, posterior à desidratação numa série gradiente de etanol, os órgãos foram incorporados em parafina usando xileno como solvente de transição e secções de 5 µm foram obtidas usando um micrótomo (Leica RM2125 RTS). Finalmente os cortes foram hidratados e corados com hematoxilina-eosina para serem observados em microscópio de luz (Olympus BX41). Imagens digitais foram tomadas usando uma câmera digital de alta resolução (Olympus DP25). No total foram usados três ovipositores.

### **3.4. Extração da glândula feromonal**

As glândulas de feromônio sexual foram extraídas de fêmeas virgens com um a dois dias de idade, no momento em que apresentaram comportamento de chamamento (entre a segunda e sexta hora da escotofase) e imersas em 15 µL de Hexano (grau HPLC) por glândula. Após 30 minutos de extração com solvente, o sobrenadante foi transferido e

concentrado para 200  $\mu\text{L}$ . Um total de 12 extratos, contendo de 10 a 90 glândulas por extrato, foi obtido. Uma solução de tridecano 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi usado como padrão interno.

### 3.5. Análises Cromatográficas

Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa (GC) em um Cromatógrafo Shimadzu GC-2010 acoplado a um detector de ionização em chama (FID). A cromatografia foi realizada em coluna capilar Rtx-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$  Restetec<sup>®</sup>) e a temperatura do forno foi mantida à 50 °C por 5 minutos, com velocidade de aquecimento de 8 °C/min até 250°C por 5 minutos. O hidrogênio foi usado como gás de arraste, com fluxo de 1.10 mL/min e a injeção de 1 $\mu\text{L}$  dos extratos foi feita no modo splitless a 250 °C, com detecção nesta mesma temperatura.

Os extratos também foram analisados em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS Shimadzu QP-2010 Ultra), usando as colunas NST-5 e NST-1 (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$  NanoSeparationTecnology<sup>®</sup>) nas mesmas condições cromatográficas do GC-FID. Foi utilizado hélio como gás de arraste (1.10 mL/min). O espectrômetro de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) em modo de varredura entre 35  $m/z$  e 400  $m/z$ . A fonte de íons se manteve constante a 220 °C e a interface a 250°C. A identificação dos compostos foi baseada na comparação do espectro de massas e índice de kovats com aqueles nas bases de dados NITS08, NITS08s e WILEY229.

Cromatografia gasosa acoplada à eletroantografia (GC-EAD) foi usada para analisar a atividade eletrofisiológica dos extratos glandulares e padrões sintéticos (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) frente a antenas de machos de um e dois dias de idade. Um cromatógrafo gasoso (Schimadzu, GC-2010) equipado com uma coluna Rtx-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$  Restetec<sup>®</sup>) nas mesmas condições cromatográficas do GC-FID. O efluente da coluna foi dividido com um conector Y em duas ramificações de 0.25 mm d.i., uma ramificação em direção ao detector de ionização de chama (FID) 250°C e a outra para uma linha de transferência aquecida (200°C) com conexão ao capilar de vidro de liberação de estímulo. O efluente do capilar foi diluído com ar umidificado.

A antena foi removida de machos de um a dois dias de idade previamente anestesiados ao frio e os flagelômeros da região apical da antena foram cortados antes de colocá-la nos eletrodos de prata com gel condutor Spectra 360 (Parker lab. Inc., Hellendoorn, Holanda). Posteriormente foi posicionada perpendicularmente ao fluxo de ar proveniente do capilar de

liberação. A amplificação dos sinais elétricos foi feita em um amplificador de alta impedância (IDA-4, Syntech Hilversum, Holanda) e analisados utilizando o programa Syntech GC-EAD32 versão 4.6, 2008. Apenas uma das antenas do inseto foi usada para cada ensaio. Um total de 12 ensaios com o extrato da glândula e 8 ensaios com mistura de padrões foi realizado.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Morfologia geral da antena

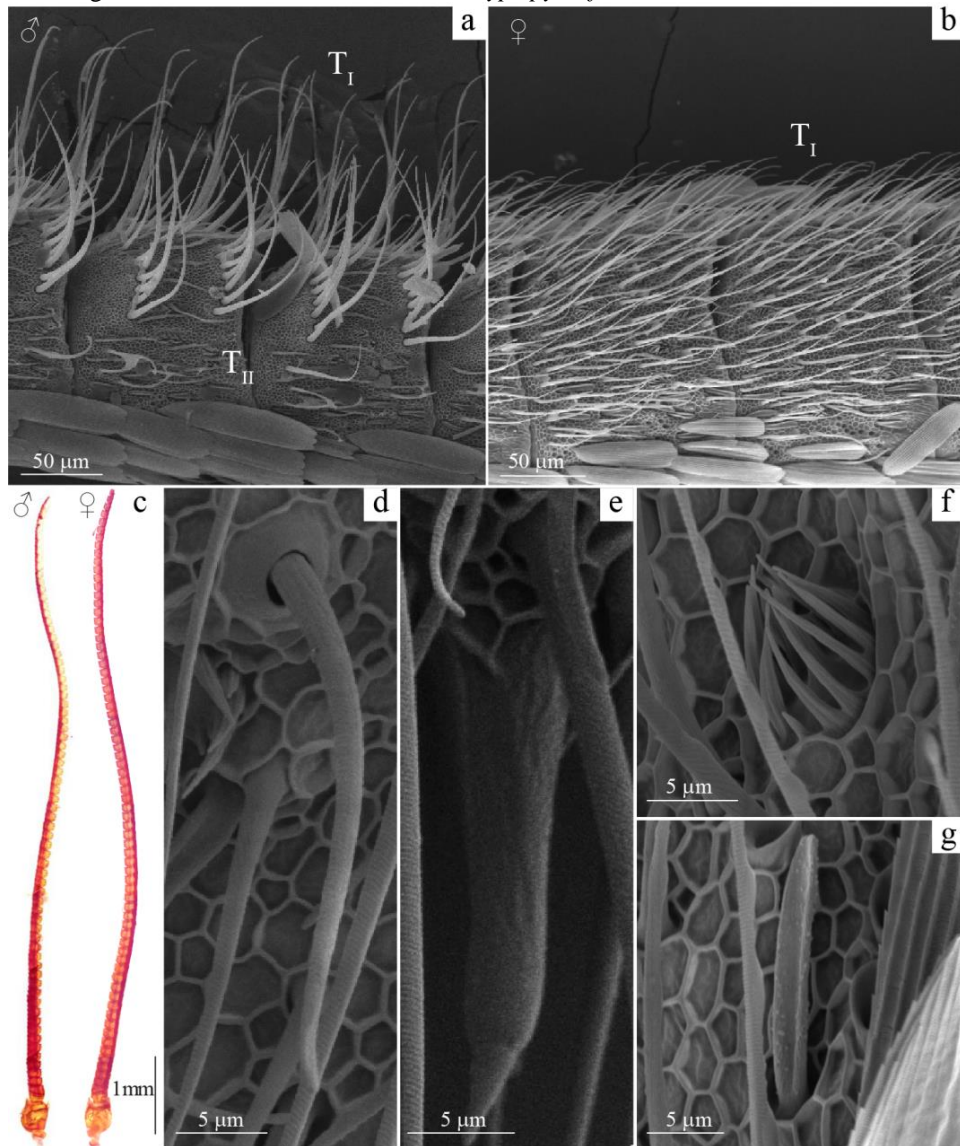
As antenas de ambos os sexos de *H. ferrealis* são filiformes e consistem de três segmentos: escapo, pedicelo e um longo flagelo composto por 71-75 segmentos (Figura 1c) (Tabela 1). As superfícies do escapo e pedicelo são cobertas com escamas sobrepostas e apresentam cerdas de Böhm, estruturas semelhantes a espinhas, distribuídas em grupos na base do escapo e união do escapo e pedicelo. O flagelo está dividido por uma superfície dorsal composta por duas filas de escamas por flagelômero na qual a segunda fila de escamas se sobrepõe à primeira fila do seguinte flagelômero e uma superfície ventral composta exclusivamente de sensilas. O comprimento e a largura dos flagelômeros diminuíram da base para o ápice ( $109,6 \pm 1,2 \mu\text{m}$  de largura e  $178,4 \pm 1,6 \mu\text{m}$  de comprimento entre o 5° ao 10° flagelômero para  $90,7 \pm 0,9 \mu\text{m}$  de largura e  $98,0 \pm 1,1 \mu\text{m}$  de comprimento nos últimos 10 segmentos, N=8).

**Tabela 1** - Características gerais da antena de *Hypsipyla ferrealis*.

	Comprimento da Antena ( $\mu\text{m}$ )	Escapo ( $\mu\text{m}$ )		Pedicelo ( $\mu\text{m}$ )		N° de flagelômeros
		Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )	
♀	$8230,6 \pm 145,5$	$350,6 \pm 12,1$	$297,5 \pm 17,3$	$113,8 \pm 4,3$	$182,1 \pm 5,8$	$74 \pm 1$
♂	$8215,1 \pm 170,5$	$372,1 \pm 23,3$	$375,2 \pm 10,3^*$	$126,3 \pm 8,7$	$221,0 \pm 7,3^*$	$72 \pm 1$

A diferença entre as médias para os sexos em cada coluna seguida de \* é significativa ( $p < 0,05$ ; teste t para amostras independentes, média  $\pm$  EPM, N = 8 por sexo).

**Figura 1** - Morfologia da antena de macho e fêmea de *Hypsipylla ferrealis*.



(a) Vista lateral ventral de segmento do flagelo da antena de macho mostrando a distribuição de sensilas tricoide I ( $T_I$ ) e tricoide II ( $T_{II}$ ). (b) Segmento do flagelo da antena de fêmea mostrando a distribuição de sensilas tricoides I ( $T_I$ ); (c) Antenas filiformes de ambos sexos; (d) Sensila caética; (e) Sensila estilônica; (f) Sensila coelocônica e (g) Sensila auricflica.

#### 4.2. Diferentes tipos de sensilas antenais

Seis tipos morfológicos de sensilas foram observados em antenas de fêmeas e de machos de *H. ferrealis*: sensila tricoide, sensila caética, sensila estilocônica, sensila coelocônica e sensila auricflica. As sensilas tricoides são classificadas em dois subtipos de acordo com o comprimento,  $T_I$  e  $T_{II}$  (Figura 1).

Sensila tricoide é o tipo de sensila mais abundante nas antenas de *H. ferrealis* e encontrada em toda a superfície ventral de todos os segmentos flagelares (Figura 1a,b). Os dois subtipos da tricoide são diferenciados pelo seu comprimento, tricoide I é mais comprida e abundante que tricoide II (Tabela 2). As tricoides I são mais proeminentes na antena do

macho e se distribuem em três linhas organizadas perpendiculares ao eixo central da antena em cada flagelômero. Além disso essas sensilas têm base redonda e eixo cilíndrico longo que decresce em direção à ponta.

Outras sensilas pouco abundantes nas antenas de ambos os sexos foram as sensilas caéticas e as sensilas estilocônicas. As sensilas caéticas têm formas retas pontiagudas e uma base larga, cercada por um colar redondo, com uma inclinação de 60° em direção à superfície da antena e sua cutícula é rugosa com sulcos longitudinais (Figura 1d). Uma sensila estilocônica está localizada na parte central da borda distal de cada segmento em ambos os sexos. Essas sensilas são largas de eixo cilíndrico com ponta cônica, levemente curvadas em direção à ponta da antena e com superfície rugosa (Figura 1e).

Sensilas de dimensões menores como as sensilas coelocônicas e as sensilas auricílicas estão presentes ao longo da superfície ventral. As sensilas coelocônicas estão compostas por 9-12 pequenas estruturas lisas, “espinhos” com base circular que cercam uma sensila central (Figura 1f). As sensilas auricílicas, com aparência de uma folha, superfície lisa e algumas protuberâncias granulares, se situam principalmente nas laterais do flagelômero próximas das escamas (Figura 1g).

Ainda que ambos os sexos compartilhem os mesmos tipos de sensilas, observou-se dimorfismo sexual quanto ao comprimento das sensilas tricoide, caética e estilocônica. Estas sensilas nas antenas de machos apresentam comprimentos maiores que em fêmeas (Tabela 2).

**Tabela 2** – Caracterização morfométrica das sensilas das antenas de fêmea e macho de *Hypsipyla ferrealis*.

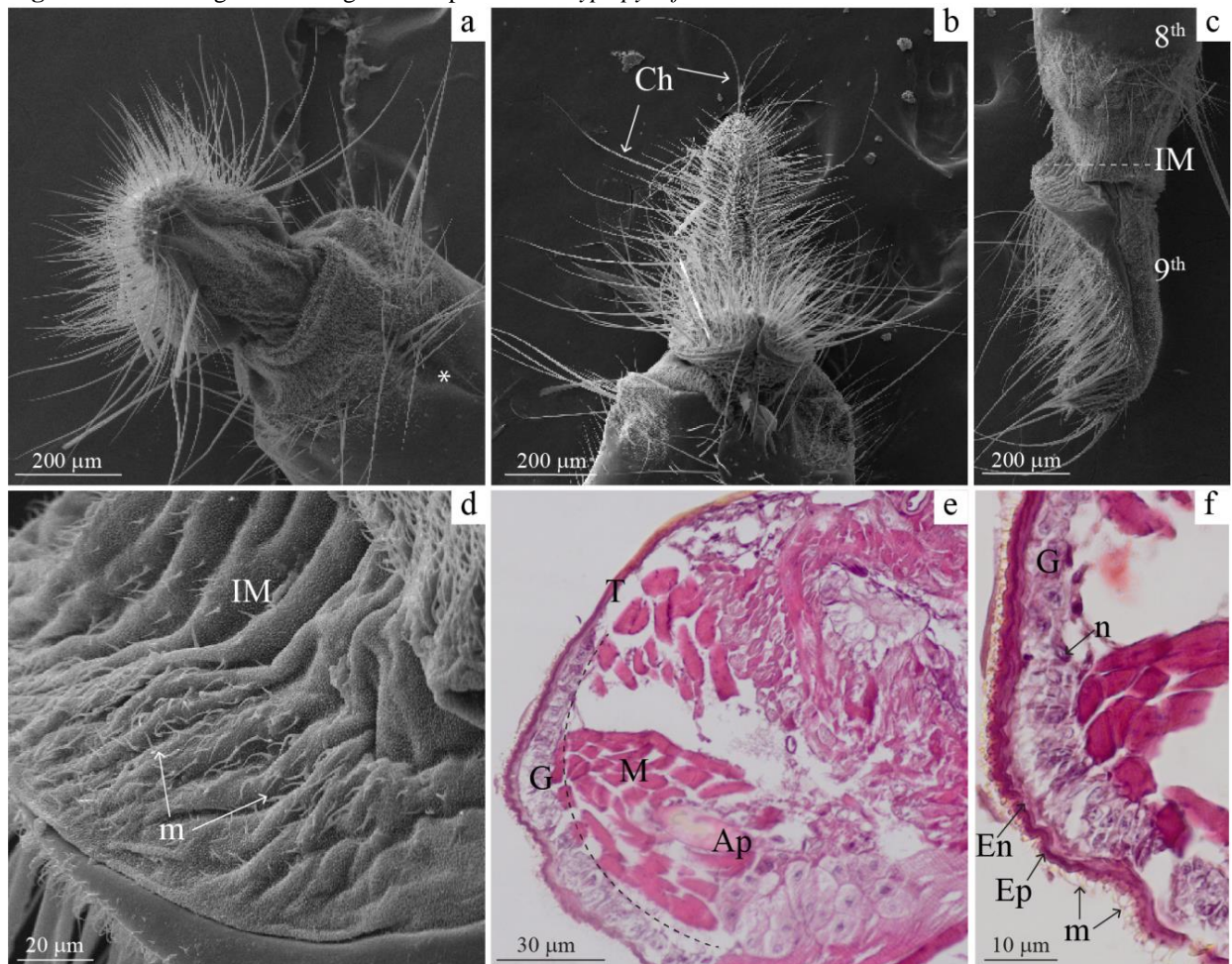
<b>Tipo de sensila</b>	<b>Gênero</b>	<b>Comprimento (µm)</b>	<b>Largura basal (µm)</b>
<b>S. tricoide I</b>	♀	61,10 ± 1,28	3,26 ± 0,10
	♂	82,21 ± 3,90*	4,93 ± 0,19*
<b>S. tricoide II</b>	♀	34,74 ± 0,76	2,14 ± 0,11
	♂	43,48 ± 1,22*	3,67 ± 0,17*
<b>S. caética</b>	♀	34,73 ± 1,12	6,32 ± 0,22
	♂	71,08 ± 2,49*	9,20 ± 0,28*
<b>S. estilocônica</b>	♀	22,72 ± 0,51	4,88 ± 0,17
	♂	16,55 ± 0,69*	5,16 ± 0,11
<b>S.coelocônica</b>	♀	-	11,10 ± 0,30
	♂	-	10,11 ± 0,33
<b>S. auricílica</b>	♀	16,34 ± 0,13	3,58 ± 0,12
	♂	15,22 ± 0,63	2,91 ± 0,11*

Valores são apresentados como média ± EPM. A diferença entre as medias para os sexos em cada coluna seguida por \* é significante ( $p < 0.05$ ; teste-t amostras independentes). N = 12 por tipo de sensila.

### 4.3. Morfologia e histologia do ovipositor

A fêmea adulta de *H. ferrealis* tem 9 segmentos abdominais distinguíveis. Os segmentos 1-7 estão cobertos com escamas e os segmentos 8 e 9 formam o ovipositor que normalmente permanece retraído nos segmentos anteriores. A abertura da bursa está localizada no final do 8º segmento (Figura 2a), o qual é altamente esclerotizado. O segmento 9 forma as papilas anais que são caracterizadas pela presença de numerosas e compridas sensilas caéticas (comprimento  $206.8 \pm 9.9 \mu\text{m}$  e largura  $6.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ,  $N=12$ ) e pequenas projeções semelhantes a pêlos superficiais da cutícula conhecidas como *microtrichae* (comprimento  $6.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$  e largura  $1.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ,  $N=12$ ) (Figura 2b,c).

**Figura 2** - Morfologia e histologia do ovipositor de *Hypsipyla ferrealis*.



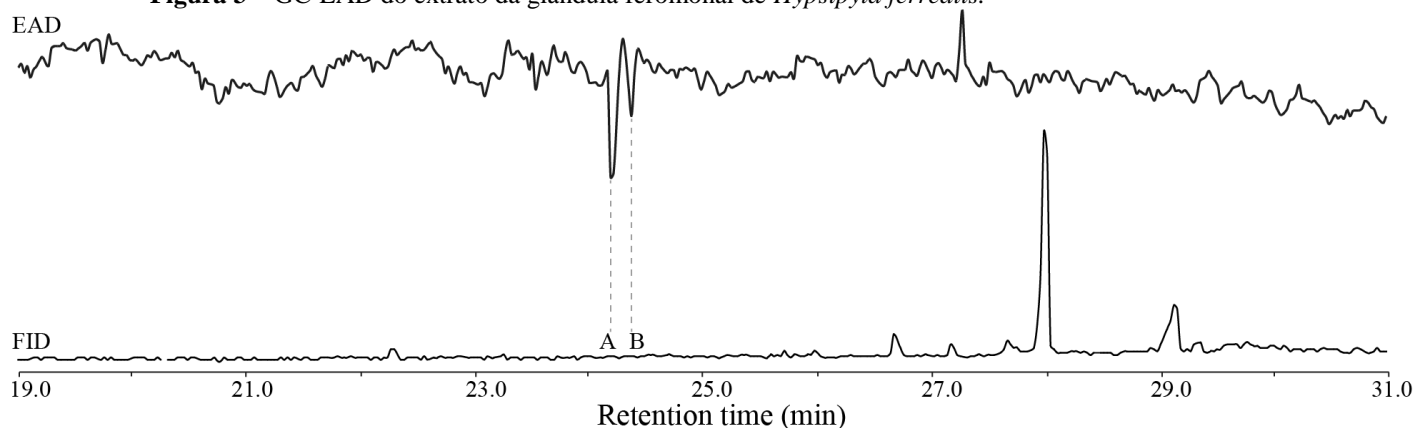
(a) Vista dorsal do ovipositor mostrando a abertura da bursa (\*) no 8º urômero. (b) Vista ventral do ovipositor com numerosas sensilas caéticas (Ch). (c) Vista lateral do ovipositor mostrando 8º urômero, membrana intersegmental (IM) e 9º urômero. (d) membrana intersegmental (IM) com protuberâncias granulares e numerosas *microtrichae* (m). (e) Secção transversal da membrana intersegmental mostrando células colunares, região glandular (G), tecido muscular (M), tegumento (T) e apódema (Ap). (f) Ampliação da região glandular mostrando a endocutícula (En), epicutícula (Ep), numerosas *microtrichae* (m) sobre as células colunares e o núcleo destas (n).

A membrana intersegmental entre os segmentos abdominais 8 e 9 é dividida em uma metade dorsal e outra ventral. Esta membrana está coberta por uma série contínua de proeminentes protuberâncias granulares e sulcos irregulares e profundos com numerosas *microtrichae* (Figura 2d). Na região dorsolateral, a membrana intersegmentar apresenta uma camada única de células epidérmicas colunares hipertrofiadas com proeminente núcleo esférico, numerosos vacúolos e dobraduras na membrana plasmática apical. Estas células estão protegidas pelo tegumento e unicamente sobre a região destas células é observada presença de *microtrichae*, conformando a região glandular do ovipositor (Figura 2e,f). Células musculares rodeando os apódemas também são observadas na membrana intersegmental.

#### 4.4. Composição da glândula feromonal

Nos extratos da glândula feromonal da fêmea foram identificados 22 compostos (Tabela 3), dos quais dois compostos (A e B) desencadearam respostas consistentes nas antenas masculinas em experimentos de GC-EAD (Figura 3a). O composto A tem concentração de  $0,021 \pm 0,002$  ng/♀, e o composto B  $0,042 \pm 0,007$  ng/♀ (relação 1:2, N=4). Em uma coluna Rtx-5 de baixa polaridade, os índices de Kovats (KI) destes compostos foram 1665 e 1672, respectivamente.

**Figura 3** – GC-EAD do extrato da glândula feromonal de *Hypsipyla ferrealis*.



Eletoantenograma da antena de macho frente a extrato da glândula sexual da fêmea mostrando atividade para os compostos A e B.



**Tabela 3** – Composição química dos extratos da glândula sexual de *Hypsipyla ferrealis*

Compostos	KI (NST-1) <sup>a</sup>	KI (NST-5) <sup>b</sup>	ng/insect <sup>c</sup>	Identificação
(Z)-9-Tetradecenal	1564	1582	0,01	P
Acetato de (Z)-9-dodecenila	1566	1588	0,01	P
Tetradecanal	1592	1610	0,02	P
Hexadecano	1600	1600	0,04	P
(E,Z)-9,12-Tetradecadienol	1655	1665	0,02	P
(E)-12-Tetradecenol	1665	1672	0,04	P
Pentadecanal	1694	1713	0,06	
Heptadecano	1700	1700	0,01	P
Ácido tetradecanoico	1739	1754	0,14	P
Hexadecanal	1796	1815	0,02	
Octadecano	1800	1800	0,02	P
Ácido pentadecanoico	1838	1854	0,06	P
Hexadecanol	1863	1878	0,05	P
Nonadecano	1899	1900	0,02	P
Ácido (Z)-9-hexadecenoico	1924	1936	0,07	P
Ácido hexadecanoico	1942	1960	1,93	P
(Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienol	2033	2061	0,04	P
(Z)-9-Octadecenol	2039	2063	0,02	P
Octadecanol	2067	2083	0,06	P
Ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico	2105	2134	0,56	P
Ácido (Z)-9-octadecenoico	2115	2140	1,61	P
Ácido octadecanoico	2140	2159	0,43	P

Cada composto foi analisado por GC-MS equipado com coluna NST-1<sup>a</sup> ou NST-5<sup>b</sup> e identificado com padrão (P) autêntico.

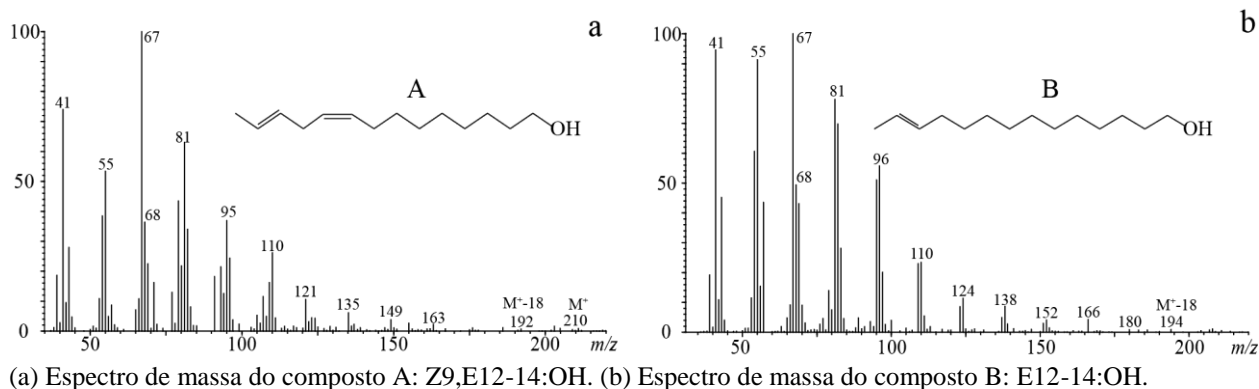
Nas condições usadas, o espectro de massa de A (Figura 4a) apresenta íon molecular  $m/z$  210 (0,2%  $M^+$ ), sugerindo que a fórmula molecular deste seria  $C_{14}H_{26}O$ . A presença do fragmento  $m/z$  192 (0,7%  $M^+-18$ ) referente à perda de uma molécula de água. O pico base é o íon  $m/z$  67 (100%) que faz parte de uma sequência de fragmentos com aumento de 14 unidades de massa ( $CH_2$ ), o qual sugere linearidade da cadeia carbônica;  $m/z$  41 (74%), 55 (53%), 81 (63%), 95 (37%) e 110 (26%). O grau de insaturação da molécula sugere a presença de duas ligações duplas que geram os íons fragmentos  $m/z$  121 (10%), 135 (6%), 149 (4%) e 163 (2%). Deste modo, o composto A foi identificado como um tetradecadienol.

As insaturações na posição 9,12- de compostos feromonais com cadeia linear de 14 carbonos esta presente na *H. grandella* e *H. robusta*<sup>18;21</sup> Deste modo, os compostos prováveis seriam os diastereoisômeros (Z,E)-9,12-tetradecadienol e (Z,Z)-9,12-tetradecadienol que apresentam eluição próxima em coluna de baixa polaridade.<sup>18</sup> A coinjeção do extrato glândular com mistura de padrões contendo (Z,E)-9,12-tetradecadienol permitiu finalmente confirmar este como sendo o composto A (Figura 5).

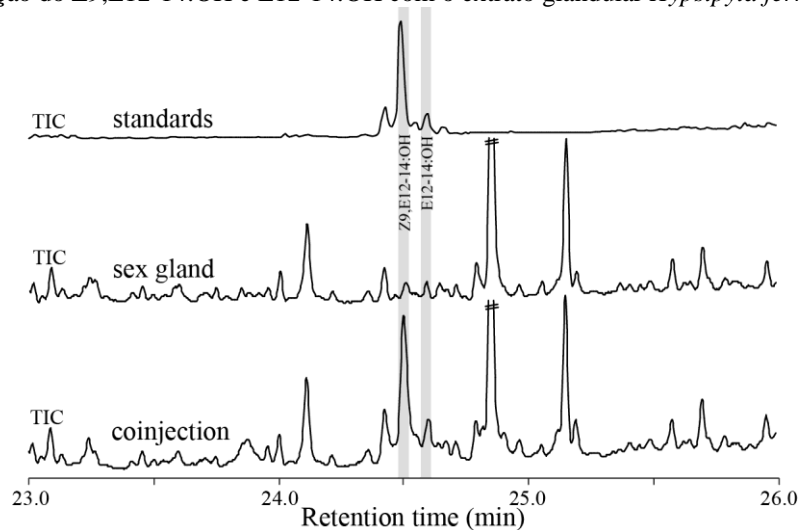
Nas condições usadas, o espectro de massa de A (Figura 4a) apresenta íon molecular  $m/z$  210 (0,2%,  $M^+$ ), sugerindo que a fórmula molecular deste seria  $C_{14}H_{26}O$ . A presença do fragmento  $m/z$  192 (0,7%,  $M^+-18$ ) referente à perda de uma molécula de água. O pico base é o íon  $m/z$  67 (100%) que faz parte de uma sequência de fragmentos com aumento de 14 unidades de masa ( $CH_2$ ), o qual sugere linearidade da cadeia carbônica;  $m/z$  41 (74%), 55 (53%), 81 (63%), 95 (37%) e 110 (26%). O grau de insaturação da molécula sugere a presença de duas ligações duplas que geram os íons fragmentos  $m/z$  121 (10%), 135 (6%), 149 (4%) e 163 (2%). Deste modo, o composto A foi identificado como um tetradecadienol.

A fragmentação do composto B apresenta íon fragmento resultante da perda de uma molécula de água  $m/z$  194 (1%,  $M^+-18$ ) e a sequência de fragmentos com aumento de 14 unidades de masa ( $CH_2$ ) e com intensidades decrescentes que sugerem linearidade da cadeia carbônica é a presença de uma insaturação na molécula [ $m/z$  41 (94%), 55 (91%), 67 (100%), 81 (78%) e 95 (55%)] (Figura 4b). A coinjeção do extrato glandular com mistura de padrões contendo (*E*)-12-tetradecenol permitiu finalmente confirmar este como sendo o composto B (Figura 5).

**Figura 4** – Espectro de massa dos compostos EAD ativos na glândula feromonal de *Hypsipyla ferrealis*.



**Figura 5** – Coinjeção do Z9,E12-14:OH e E12-14:OH com o extrato glandular *Hypsipyla ferrealis*



Comparação dos cromatogramas de íons totais (TIC) da mistura de padrões ((*Z*)-9-tetradecenol, (*Z,E*)-9,12-tetradecadienol, (*E*)-12-tetradecenol e (*Z*)-12-tetradecenol), o extrato da glândula sexual de *Hypsipyla ferrealis* e a coinjeção destes.

## 5. DISCUSÃO

A antena filiforme de adultos de *H. ferrealis* é semelhante à de outras mariposas Pyralidae, tais como *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879,<sup>23</sup> *Homoeosoma nebulella* (Denis & Schiffermüller, 1775)<sup>24</sup> e *Zamagiria dixolophella* Dyar, 1914.<sup>25</sup> A base da antena está constituída pelo escapo e o pedicelo, estes dois estão cobertos por escamas. Na base do escapo e na união do escapo e pedicelo foram observados pelos de Böhm, pequenas estruturas que, pela sua localização, podem estar associadas à sensibilidade mecânica ou a uma função proprioceptiva para monitorar o movimento das antenas.<sup>24-28</sup>

Normalmente em Lepidoptera, o flagelo da antena se divide em uma superfície sensilar e outra coberta por escamas. Tem-se especulado que esta disposição permite proteger as sensilas de dano mecânico, favorecer a capacidade do inseto de detectar a direção de um estímulo e servir como mecanismo para concentrar moléculas voláteis.<sup>26;29</sup>

O tamanho da antena e de seus segmentos, assim como o número de flagelômeros, não apresentaram dimorfismo sexual. No entanto, a disposição das sensilas tricoides mais compridas é claramente diferente entre os sexos (Figura 1a e 1b). Este dimorfismo é frequentemente observado em espécies que usam feromônios sexuais.<sup>30</sup> Machos com sensilas maiores têm maior zona sensorial na antena para percepção do feromônio sexual, pelo qual podem ser considerados como receptores na comunicação química sexual.<sup>31</sup>

Um total de seis diferentes tipos de sensilas antenais foram identificados em adultos de *H. ferrealis* neste estudo. Sensila tricoide I, sensila tricoide II, sensila caética, sensila estilocônica, sensila coelocônica e sensila auricíllica têm sido reportadas anteriormente em antenas de outras espécies da família Pyralidae, tais como *E. kuehniella*,<sup>23</sup> *H. nebulella*<sup>24</sup> e *Z. dixolophella*.<sup>25</sup>

Estas sensilas morfologicamente diversas representam todo um repertório de sistema de detecção sensorial no inseto. Embora esteja fora do âmbito deste estudo discutir ou elucidar as funções destas sensilas, algumas sensilas reportadas para *H. ferrealis* têm sido alvo de estudos eletrofisiológicos e ultraestruturais em outras espécies da família Pyralidae, de modo a elucidar suas funções bioógicas.<sup>32</sup> Por exemplo, todas as sensilas aqui descritas, com exceção da sensila estilocônica, apresentam porosidade e são responsáveis pela percepção de estímulos químicos.<sup>33-35</sup> Sensilas sem porosidade têm sido associadas com a percepção de umidade, temperatura e estímulos mecânicos.<sup>36;37</sup>

As sensilas tricoides são frequentemente polimórficas. Várias pesquisas descrevem a presença de pelo menos dois subtipos em espécies estudadas,<sup>27;28;30;38</sup> igualmente ao observado em *H. ferrealis*. As sensilas tricoide são conhecidas como sensilas receptoras olfativas,<sup>39</sup> visto que muitos estudos mostram que estas sensilas com poros bem desenvolvidos contém receptores olfativos que detectam os feromônios sexuais.<sup>36;40-42</sup> A presença de dimorfismo sexual nessas sensilas sugere que a percepção olfativa para feromônios sexuais pode estar mais desenvolvida nos machos do que nas fêmeas de *H. ferrealis*. Análises eletrofisiológicas posteriores confirmarão a funcionalidade destas sensilas.

A morfologia das sensilas caéticas de *H. ferrealis* é comum entre muitos lepidópteros.<sup>25;28;43</sup> O grau de dimorfismo sexual é aparente nas sensilas caéticas de várias espécies como *Talponia batesi* Heinrich, 1932 (Lepidoptera: Tortricidae),<sup>44</sup> *Catocala remissa* Staudinger, 1892 (Lepidoptera: Noctuidae)<sup>30</sup> e *Synanthedon scitula* (Harris, 1839) (Lepidoptera: Sesiidae).<sup>45</sup> Em *H. ferrealis*, o dimorfismo sexual é aparente no comprimento, com os machos possuindo maior dimensão. Estas sensilas cumprem função quimiorreceptora de contato ou mecanorreceptiva, uma vez que surgem de uma cavidade flexível e possuem poros terminais.<sup>37;46</sup> Receptores gustativos das sensilas caéticas em *H. virescens* auxiliam na detecção e discriminação de fontes alimentares nocivas e comestíveis.<sup>35</sup> De igual forma, estas sensilas estão envolvidas no processo de escolha de oviposição como mostrado para *Busseola fusca* (Fuller, 1901) (Lepidoptera: Noctuidae).<sup>47</sup>

A sensila estilocônica de *H. ferrealis* possui características morfológicas comuns para esse tipo de sensila em Lepidoptera. Normalmente é uma sensila cilíndrica grossa com um ou mais cones sensoriais.<sup>25:27:30</sup> A sensila estilocônica de *H. ferrealis* suporta um único cone sensorial. Adicionalmente estas sensilas contêm receptores de contato gustativos<sup>28:48</sup> e receptores termo-higro reguladores.<sup>49</sup>

As sensilas coelocônicas são altamente conservadas dentro dos lepidópteros, enquanto outros tipos de sensilas variam consideravelmente entre espécies e sexos.<sup>50</sup> Geralmente existem dois subtipos em Lepidoptera: aqueles com uma sensila central cercada por uma depressão com “espinhos” cuticulares e outra sem os “espinhos”.<sup>51:52</sup> A presença de espinhos tem sido notada em numerosas mariposas, incluindo *S. scitula*<sup>45</sup> e *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae),<sup>52</sup> e são considerados uma adaptação para proteger a sensila central contra danos físicos ou dessecação.<sup>53</sup> A sensila coelocônica descrita aqui em *H. ferrealis* existe apenas no subtipo com “espinhos”. Para os receptores deste tipo de sensila tem-se atribuído primariamente uma função olfativa, importante para detectar voláteis de plantas hospedeiras e escolher locais de oviposição.<sup>28:37:54:55</sup> Por outro lado, a ausência de porosidade na sensila sugere uma função higrorreceptora, como em *V. polistiformis*,<sup>36</sup> ou termorreceptora.<sup>37</sup>

As sensilas auricílicas são altamente polimórficas nos lepidópteros, elas podem ocorrer em forma oval, como em *Tineola bisselliella* Hummel, 1823 (Lepidoptera: Tineidae)<sup>56</sup> e *Scioloptyx libatrix* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Noctuidae),<sup>57</sup> e em forma de folha comprida, semelhante às encontradas em *Nyctemera annulata* Boisduval, 1832 (Lepidoptera: Erebidae).<sup>28</sup> A função olfativa das sensilas auricílicas é variada em *S. libatrix*,<sup>57</sup> os receptores olfativos destas sensilas detectam voláteis de plantas; em *Eriocrania semipurpurella* (Stephens, 1835) (Lepidoptera: Eriocraniidae).<sup>58</sup> Estes receptores são ativados na presença do menor componente feromonal da espécie e, adicionalmente, ainda podem cumprir dupla funcionalidade detectando voláteis de plantas e feromônio sexual, como é relatado para *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Tortricidae).<sup>59:60</sup> Com isso, pode ser sugerido que a função das sensilas auricílicas é a detecção de estímulos olfativos e que o fato de apresentar características morfológicas semelhantes em ambos sexos poderia indicar uma função comum no sistema olfativo de adultos *H. ferrealis*.

Os dimorfismos sexuais observados e a disposição das sensilas tricoides em machos indicam que estes apresentam maior área de sistema olfativo, sugerindo que a comunicação química tem um papel importante na biologia da espécie. Mariposas de hábito noturno

dependem fortemente da comunicação química para encontrar alimento, hospedeiro e, em particular, no comportamento sexual, no qual é necessária a detecção de feromônios sexuais produzidos pelas fêmeas.

As fêmeas de mariposas produzem e liberam feromônios sexuais durante o comportamento de chamamento. Investigações prévias em *H. robusta*<sup>20;21</sup> e *H. grandella*<sup>18;19</sup> têm confirmado que os últimos segmentos do abdômen destas fêmeas são a fonte do feromônio sexual. Habitualmente em Lepidoptera, a glândula sexual se situa na membrana intersegmentar retrátil entre o oitavo e nono segmento abdominal.<sup>61</sup>

Esta glândula geralmente consiste numa camada de células epiteliais cuboides ou colunares hipertrofiadas que podem ocorrer no lado ventral, lateral, dorsal ou em forma de anel na membrana intersegmentar.<sup>62-64</sup> Exames histológicos da membrana intersegmentar de *H. ferrealis* indicam que somente a parte dorsolateral contém células epiteliais colunares hipertrofiadas, como também observado para *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796) (Lepidoptera: Crambidae)<sup>63</sup> e *Amyelois transitella* (Walker, 1863) (Lepidoptera: Pyralidae).<sup>65</sup>

Em estudos prévios em outras Pyralidae, tais como, *Dioryctria abietella*. (Denis & Schiffermüller, 1775), *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879 e *Plodia interpunctella* Hübner, 1813 tem sido relatado que o epitélio glandular forma um anel ao redor da membrana intersegmentar.<sup>64;66;67</sup> No entanto, a localização exata onde a membrana se torna glandular é extremamente variável entre os lepidópteros.<sup>61</sup>

Características citológicas observadas nas células hipertrofiadas da membrana da fêmea de *H. ferrealis*, como núcleo grande, numerosos vacúolos e dobras da membrana plasmática apical são aspectos observados em células glandulares de lepidópteros.<sup>61</sup> Entretanto, outras características também encontradas em células glandulares produtoras de feromônios sexuais, tais como, presença de numerosas mitocôndrias, gotículas lipídicas na célula e na cutícula sobrejacente, mas canais porosos que atravessam a epicutícula não foram observados na *H. ferrealis*

Estes canais de poros geralmente contêm filamentos epicuticulares envolvidos na translocação do feromônio através do revestimento cuticular para o exterior.<sup>68</sup> Por exemplo, na glândula de feromônio sexual de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) foi observada a presença de gotículas excretadas na ponta dos pelos cuticulares.<sup>69</sup> Ainda que não foi possível observar a porosidade em nossos resultados, a presença de *microtrichae* unicamente sobre as células glandulares indica que podem estar funcionando da mesma forma

que em *H. zea*. Por outro lado a ausência de porosidade em algumas espécies sugere que o transporte do feromônio através da cutícula acontece por difusão, embora estas glândulas não apresentem microtrichae.<sup>38;62;70</sup>

A glândula de feromônio ocupa uma faixa bastante estreita e, para maximizar a evaporação do feromônio, é espalhada sobre uma superfície altamente convoluta com a superfície com sulcos irregulares e proeminentes protuberâncias granulares observados em *H. ferreali*. Estas protuberâncias são expostas durante o comportamento de chamamento da fêmea permitindo um alargamento da área para a disseminação do feromônio e podendo potencializar o sistema de liberação dos voláteis. Assim, a cutícula pode desempenhar um papel importante na regulação da emissão de feromônios, podendo ser responsável por uma taxa controlada de liberação de feromônios em pequenas porções, como é especulado para *Cameraria ohridella* Deschka & Dimić, 1986 (Lepidoptera: Gracillariidae).<sup>62</sup>

Feromônios sexuais de fêmeas de Lepidoptera foram identificados em mais de 600 espécies.<sup>71</sup> Dentre eles, aproximadamente 30% são estudos realizados em mariposas da Superfamília Pyraloidea.<sup>72;73</sup> Características na estrutura química e na via biossintética destes compostos são usadas para classificar os feromônios femininos. Deste modo os feromônios tipo I compreendem alcoóis, aldeídos e acetatos de cadeias hidrocarbonadas lineares de 10 a 18 carbonos com uma, duas ou três insaturações e são biossintetizados de *novo* na glândula sexual.<sup>71;74</sup>

Em nosso estudo, detectamos dois compostos ativos em ensaios de GC-EAD para a antena de machos, estes dois compostos em baixas concentrações como observado em outras espécies Pyralidae.<sup>75</sup> Com base no tempo de retenção, na fragmentação e comparação com padrões sugerimos que estes dois compostos são Z9,E12-14:OH e E12-14:OH. A estrutura molecular destes compostos os classifica como feromônios sexuais tipo I de mariposas. O composto majoritário (E12-14:OH) não tem sido relatado como feromônio sexual em mariposas, no entanto a posição 12 da insaturação em cadeias de 14 carbonos tem sido relatada previamente na mistura feromonal de *Ostrinia furnacalis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Crambidae),<sup>76</sup> nos compostos Z12-14:OAc e E12-14:OAc. De igual forma, esta posição também tem sido observada em cadeias de 16 carbonos como o Z12-16:OAc presente na glândula sexual de *Pseudexentera spoliata* (Clemens, 1864) (Lepidoptera: Tortricidae).<sup>77</sup>

Por outro lado, Z9,E12-14:OH tem sido relatado em espécies da família Pyralidae, muitas vezes como componente minoritário da mistura feromonal, sendo o majoritário o respectivo dienil acetato, observado em *P. interpunctella*,<sup>78</sup> *E. kuehniella*, *Ephestia elutella*

(Hübner, 1796),<sup>79;80</sup> e *Cactoblastis cactorum* (Berg, 1885).<sup>81</sup> Em compensação, algumas espécies do gênero *Euzophera* apresentam o Z9,E12-14:OH como componente majoritário na mistura feromonal.<sup>75;82;83</sup>

Dentro do gênero *Hypsipyla* o feromônio sexual tem sido relatado como álcoois e acetatos de cadeias mono ou di-insaturadas de 14 carbonos, sendo que os compostos Z9-14:OH, Z9-14:OAc e Z9E12-14:OAc estão presentes na mistura feromonal das duas espécies estudadas até a atualidade, *H. grandella* e *H. robusta*.<sup>17-21</sup> Adicionalmente, *H. grandella*, igual que *H. ferrealis*, apresentam como componente da glândula sexual o Z9E12-14:OH, deste modo está claro que a química dos feromônios é altamente conservada dentro dos membros do gênero *Hypsipyla*. Isso se deve ao fato que todos estes compostos estão intimamente relacionados biossinteticamente. Z9E12-14:OH é formado pela ação de uma  $\Delta 11$ -dessaturase no ácido palmítico e posterior encurtamento da cadeia por dois carbonos para dar um intermediário Z9-14:acila, que é então dessaturado novamente com uma  $\Delta 12$ -dessaturase específica e, finalmente, é reduzido.<sup>84</sup> De igual forma, o E12-14:OH pode ser formado pela ação da mesma  $\Delta 12$ -dessaturase após o encurtamento de dois carbonos na cadeia do ácido palmítico e finalmente reduzido.

Blassioli-Moraes et al. (2017) especularam que a presença de Z9,Z12-14:OH e Z9,Z12-14:OAc em *H. grandella* pode ser um discriminante para o isolamento reprodutivo da espécie. A especificidade do feromônio sexual nas mariposas é um vetor primário no isolamento reprodutivo. Características como a estereoquímica dos compostos e as proporções entre estes podem desencadear respostas diferentes em espécies diferentes.<sup>85</sup> Deste modo, pode-se supor que *H. grandella* e *H. ferrealis*, espécies que coabitam,<sup>12</sup> permanecem isoladas reprodutivamente, mesmo possuindo estruturas químicas dos componentes do feromônio sexual similares, mas com suas configurações e proporções são diferentes. No entanto, estudos ecológicos e evolutivos são necessários para esclarecer o isolamento reprodutivo destas espécies.

Neste estudo, a morfologia das antenas e sensilas antenais de *H. ferrealis* foram analisadas, e a estrutura e localização da glândula feromonal sexual feminina foi também determinada. Adicionalmente, nós propomos Z9,E12-14:OH e E12-14:OH como candidatos a componentes feromonais com base nas análises do extrato da glândula feromonal de fêmeas durante o período de chamamento. Essas análises nos permitem entender melhor os mecanismos olfativos para comunicação química entre machos e fêmeas. Outras análises



químicas, eletrofisiológicas e comportamentais, incluindo GC-EAD dos padrões e testes de campo permitirão concretizar a identificação do feromônio sexual de *H. ferrealis*.

## 6. REFERÊNCIAS

1. RANYSE B. QUERINO; HÉLIO TONINI; ALBERTO L. MARSARO JÚNIOR et al. Predação de Sementes de Andiroba (*Carapa spp.*) por *Hypsipyla ferrealis* Hampson (Lepidoptera: Pyralidae) em Roraima. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa Roraima**, v. 05, p. 19, 2008.
2. JESUS-BARROS, C. R. D.; LIRA-GUEDES, A. C.; GUEDES, M. C. et al. Perdas na produção de sementes de andiroba ocasionadas pela Broca-da-Andiroba (*Hypsipyla spp.*) (Lepidoptera: Pyralidae) no Sul do Estado do Amapá. **Comunicado Técnico 133 Embrapa Amapá**, v. 1, p. 4, 2014.
3. PINTO, A. A. Avaliação de danos causados por insetos em sementes de Andiroba [(*Carapa guianensis* Aubl.) e Andirobinha (*C. procera* DC.) (Meliaceae)] na Reserva Florestal Adolpho Ducke em Manaus, AM, Brasil. 2007.
4. LIMA, A. D. S. Produção, biometria e germinação de sementes de andirobeiras (*Carapa spp.*) da APA da Fazendinha, Macapá, AP. **Embrapa Amapá-Teses/dissertações (ALICE)**, 2010.
5. SANTOS, M. A. C. D.; NETO, S. V. D. C. Aproveitamento da castanha de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) em várzeas do estuário amazônico - Amapá- Brasil. **Revista Pesquisa e Iniciação Científica**, v. 4, p. 46-9, 2010.
6. AMBROZIN, A. R. P.; LEITE, A. C.; BUENO, F. C. et al. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 542-7, 2006.
7. SILVA, O. S.; PROPHIRO, J. S.; NOGARED, J. C. et al. Larvicidal effect of andiroba oil, *Carapa guianensis* (Meliaceae), against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 4, p. 699-702, 2006.
8. FERREIRA, M. R. A.; SANTIAGO, R. R.; DE SOUZA, T. P. et al. Development and Evaluation of Emulsions from *Carapa guianensis* (Andiroba) Oil. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1383-90, 2010.
9. FLOYD, R.; HAUXWELL, C., editors. *Hypsipyla* shoot borers in Meliaceae. Proceedings of international workshop held in Kandy, Sri Lanka; 2001.
10. BECKER, V. O. Observaciones sobre la biología de *H. ferrealis* (Hampson), una especie afin en Estudios sobre el barrenador *Hypsipyla grandella* (Zeller) Lepidoptera, Pyralidae. **CATIE**, v. 2, n. 101, p. 154-61, 1976.
11. SILVA, C. B. D. **Biologia da Broca-da-andiroba; *Hypsipyla ferrealis* Hampson (Lepidoptera: Pyralidae), em laboratório.** 2015. 38 f. Graduação - Engenharia Florestal Universidade do Estado do Amapá, Amapá-Brasil.
12. JESUS-BARROS, C. R. D.; LIRA-GUEDES, A. C.; GUEDES, M. C. et al. Registro da ocorrência de *Hypsipyla ferrealis* e *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) em frutos de andirobeiras (*Carapa guianensis*, Meliaceae) em Macapá - AP, Brasil. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 3, p. 765-9, 2015.

13. SANTOS, R. S.; PELLICCIOTTI, A. S. Primeira ocorrência de *Hypsipyla ferrealis* (Lepidoptera: Pyralidae) em andiroba (*Carapa guianensis*) no Estado do Acre. **congresso brasileiro de zoologia**, v. Resumo em anais de congresso (ALICE), p. 1, 2014.
14. SANTOS, R. S.; PELLICCIOTTI, A. S. Occurrence of *Hypsipyla ferrealis* Hampson (Lepidoptera: Pyralidae) in andiroba in the state of Acre. **Ciencia Florestal**, v. 26, n. 3, p. 995-8, 2016.
15. SOUZA, J. C. D.; SOTHE, C.; CASTILHO, C. V. D. et al. Taxa de germinação de sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) predadas por *Hypsipyla ferrealis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Resumos da Reunião Regional da SBPC em Boa Vista**, 2010.
16. PENA, J. W. P. **Frutificação, produção e predação de sementes de *Carapa guianensis* Aubl. (meliaceae) na Amazônia oriental brasileira**. 2007. 60 f. Mestre - Ciências Florestais Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém.
17. BOREK, V.; KALINOVA, B.; VALTEROVA, I. et al. Sex-Pheromone Gland Volatiles from *Hypsipyla-Grandella* Females (Lepidoptera, Pyralidae, Phycitinae). **Acta Entomologica Bohemoslovaca**, v. 88, n. 3-4, p. 181-6, 1991.
18. BLASSIOLI-MORAES, M. C.; BORGES, M.; LAUMANN, R. A. et al. Identification and field evaluation of a new blend of the sex pheromone of *Hypsipyla grandella*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, p. 977-86, 2017.
19. PINEDA-RIOS, J. M.; TOVAR, J. C.; SÁMANO, J. M. et al. La composición y proporción de los componentes de la feromona sexual de *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) varía dependiendo de la técnica utilizada para su aislamiento. **Entomotropica**, v. 31, p. 172-85, 2016.
20. ASSIRI BOSSON, G.; GALLOIS, M. Analysis of pheromonal secretion in virgin females of *Hypsipyla robusta* (Moore) (Lepidoptera, Pyralidae, Phycitinae) from young mahogany shoots. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences Sciences de la Vie (France)**, v. 3, 1982.
21. MA, T.; LIU, Z.; LU, J. et al. A key compound: (Z)-9-tetradecen-1-ol as sex pheromone active component of *Hypsipyla robusta* (Lepidoptera: Pyralidae). **Chemoecology**, v. 25, n. 6, p. 325-30, 2015.
22. BUTT, B. A.; CANTU, E. **sex determination of lepidopterous pupae**. Washington, USDA; 1962. p 7.
23. ANDERSON, P.; HALLBERG, E. Structure and distribution of tactile and bimodal taste/tactile sensilla on the ovipositor, tarsi and antennae of the flour moth, *Ephestia kuehniella* (Zeller)(Lepidoptera: Pyralidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 19, n. 1, p. 13-23, 1990.
24. FAUCHEUX, M. J. Morphology and distribution of sensilia on the cephalic appendages, tarsi and ovipositor of the European sunflower moth, *Homoeosoma nebulella* Den. & Schiff. (Lepidoptera : Pyralidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 20, n. 6, p. 291-307, 1991.
25. CASTREJÓN, G. V. R.; NIETO, G.; VALDES, J. et al. The antennal sensilla of *Zamagiria dixolophella* Dyar (Lepidoptera : Pyralidae). **Ann Entomol Soc Am**, v. 96, n. 5, p. 672-8, 2003.

26. VAN DER PERS, J. N. C.; CUPERUS, P. L.; DEN OTTER, C. J. Distribution of sense organs on male antennae of small ermine moths, *Yponomeuta spp.* (Lepidoptera: Yponomeutidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 9, n. 1, p. 15-23, 1980.
27. YAN, X.-Z.; DENG, C.-P.; XIE, J.-X. et al. Distribution patterns and morphology of sensilla on the antennae of *Plutella xylostella* (L.)—A scanning and transmission electron microscopic study. **Micron**, v. 103, p. 1-11, 2017.
28. MARK, C. J.; PARSONS, S.; HOLWELL, G. I. Antennal morphology and micro-sensory architecture of the New Zealand magpie moth, *Nyctemera annulata* (Lepidoptera: Erebiidae): diversity, distribution and dimorphism. **Aust Entomol**, v. 57, n. 3, p. 303-23, 2017.
29. WALL, C. Morphology and histology of the antenna of *Cydia nigricana* (F.) (Lepidoptera : Tortricidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 7, n. 3, p. 237-50, 1978.
30. ZHENG, H.; LIU, H.; GUO, S. et al. Scanning electron microscopy study of the antennal sensilla of *Catocala remissa*. **B Insectol**, v. 67, n. 1, p. 63-71, 2014.
31. ROMERO-LÓPEZ, A.; MORÓN, M.; VALDEZ, J. Sexual dimorphism in antennal receptors of *Phyllophaga ravidata* Blanchard (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae). **Neotrop Entomol**, v. 39, p. 957-66, 2010.
32. KHUHHRO, S. A.; LIAO, H.; DONG, X.-T. et al. Two general odorant binding proteins display high bindings to both host plant volatiles and sex pheromones in a pyralid moth *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **J Asia-Pac Entomol**, v. 20, n. 2, p. 521-8, 2017.
33. LEAL, W. S. Pheromone reception. Schulz S (Ed.). In: **The chemistry of pheromones and other semiochemicals II Top Curr Chem**. Berlin: Springer, 2004. v. 240, p. 1-36.
34. XIAO, S.; MAN-QUN, W.; GUOAN, Z. Ultrastructural observations on antennal sensilla of *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Microsc Res Techniq**, v. 74, n. 2, p. 113-21, 2011.
35. JØRGENSEN, K.; ALMAAS, T. J.; MARION-POLL, F. et al. Electrophysiological characterization of responses from gustatory receptor neurons of sensilla chaetica in the moth *Heliothis virescens*. **Chem Senses**, v. 32, n. 9, p. 863-79, 2007.
36. SANDERS, W. R. **Sounds and smells of a subterranean sesiid: Acoustic detection and mating disruption of grape root borer**. 2010. f. Master of science - University of Florida
37. ALTNER, H.; PRILLINGER, L. Ultrastructure of invertebrate chemo-, thermo-, and hygrosensors and its functional significance. In: **International Review of Cytology**: Elsevier, 1980. v. 67, p. 69-139.
38. MA, M.; CHANG, M.-M.; LU, Y. et al. Ultrastructure of sensilla of antennae and ovipositor of *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae), and location of female sex pheromone gland. **Scientific reports**, v. 7, p. 40637, 2017.
39. HANSSON, B. S. **Insect olfaction**: Springer Science & Business Media; 1999.
40. DOLZER, J.; FISCHER, K.; STENGL, M. Adaptation in pheromone-sensitive trichoid sensilla of the hawkmoth *Manduca sexta*. **J Exp Biol**, v. 206, n. 9, p. 1575-88, 2003.
41. LIN, X.; ZHANG, Q.; WU, Z. et al. Identification and differential expression of a candidate sex pheromone receptor in natural populations of *Spodoptera litura*. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0131407, 2015.

42. ZHANG, Q. H.; WU, Z. N.; ZHOU, J. J. et al. Molecular and functional characterization of a candidate sex pheromone receptor OR1 in *Spodoptera litura*. **Insect Sci**, v. 24, n. 4, p. 543-58, 2017.
43. XIANGQUN, Y.; KE, G.; FENG, Y. et al. Ultrastructure of antennal sensilla of four skipper butterflies in *Parnara sp.* and *Pelopidas sp.* (Lepidoptera: HesperIIDae). **ZooKeys**, n. 399, p. 17-27, 2014.
44. GÓMEZ, V. R. C.; CARRASCO, J. V. Morphological characteristics of antennal sensilla in *Talponia batesi* (Lepidoptera: Tortricidae). **Ann Entomol Soc Am**, v. 101, n. 1, p. 181-8, 2008.
45. FRANK, D.; LESKEY, T.; BERGH, J. Morphological characterization of antennal sensilla of the Dogwood Borer (Lepidoptera: Sesiidae). **Ann Entomol Soc Am**, v. 103, n. 6, p. 993-1002, 2010.
46. SCHNEIDER, D. Insect antennae. **Annu Rev Entomol**, v. 9, n. 1, p. 103-22, 1964.
47. CALATAYUD, P. A.; CHIMTAWI, M.; TAUBAN, D. et al. Sexual dimorphism of antennal, tarsal and ovipositor chemosensilla in the African stemborer, *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera : Noctuidae). **Ann Soc Entomol Fr**, v. 42, n. 3-4, p. 403-12, 2006.
48. JEFFERSON, R. N.; RUBIN, R. E.; MCFARLAND, S. U. et al. Sex Pheromones of Noctuid Moths. Xxii. the External Morphology of the Antennae of *Trichoplusia ni*, *Heliothis zea*, *Prodenia ornithogalli*, and *Spodoptera exigua*. **Ann Entomol Soc Am**, v. 63, n. 5, p. 1227-38, 1970.
49. STEINBRECHT, R. A. The fine structure of thermo-/hygrosensitive sensilla in the silkmoth *Bombyx mori*: Receptor membrane substructure and sensory cell contacts. **Cell Tissue Res**, v. 255, n. 1, p. 49-57, 1989.
50. CARLSSON, M. A.; SCHÄPERS, A.; NÄSSEL, D. R. et al. Organization of the olfactory system of Nymphalidae butterflies. **Chem Senses**, v. 38, n. 4, p. 355-67, 2013.
51. CASTREJÓN, G. V. R.; VALDEZ-CARRASCO, J.; CIBRIAN-TOVAR, J. et al. Morphology and distribution of the sense organs on the antennae of *Copitarsia consueta* (Lepidoptera: Noctuidae). **Fla Entomol**, v. 82, n. 4, p. 546-55, 1999.
52. DIONGUE, A.; YANG, J. T.; LAI, P. Y. Biomorphometric characteristics of different types of sensilla detected on the antenna of *Helicoverpa armigera* by scanning electron microscopy. **J Asia-Pac Entomol**, v. 16, n. 1, p. 23-8, 2013.
53. HUNGER, T.; STEINBRECHT, R. Functional morphology of a double-walled multiporous olfactory sensillum: the sensillum coeloconicum of *Bombyx mori* (Insecta, Lepidoptera). **Tissue and Cell**, v. 30, n. 1, p. 14-29, 1998.
54. POPHOF, B. Olfactory responses recorded from sensilla coeloconica of the silkmoth *Bombyx mori*. **Physiol Entomol**, v. 22, n. 3, p. 239-48, 1997.
55. SHIELDS, V.; HILDEBRAND, J. Fine structure of antennal sensilla of the female sphinx moth, *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). II. Auriculate, coeloconic, and styliform complex sensilla. **Canadian journal of zoology**, v. 77, n. 2, p. 302-13, 1999.
56. FAUCHEUX, M. J. Morphology and distribution of antennal sensilla in the female and male clothes moth, *Tineola bisselliella* Humm.(Lepidoptera: Tineidae). **Canadian journal of zoology**, v. 63, n. 2, p. 355-62, 1985.

57. ANDERSON, P.; HALLBERG, E.; SUBCHEV, M. Morphology of antennal sensilla auricillica and their detection of plant volatiles in the Herald moth, *Scoliopteryx libatrix* L. (Lepidoptera: Noctuidae). **Arthropod Struct Dev**, v. 29, n. 1, p. 33-41, 2000.
58. LARSSON, M. C.; HALLBERG, E.; KOZLOV, M. V. et al. Specialized olfactory receptor neurons mediating intra-and interspecific chemical communication in leafminer moths *Eriocrania spp.*(Lepidoptera: Eriocraniidae). **J Exp Biol**, v. 205, n. 7, p. 989-98, 2002.
59. ANSEBO, L.; IGNELL, R.; LÖFQVIST, J. et al. Responses to sex pheromone and plant odours by olfactory receptor neurons housed in sensilla auricillica of the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). **J Insect Physiol**, v. 51, n. 10, p. 1066-74, 2005.
60. EBBINGHAUS, D.; LÖSEL, P.; LINDEMANN, M. et al. Detection of major and minor sex pheromone components by the male codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). **J Insect Physiol**, v. 44, n. 1, p. 49-58, 1997.
61. PERCY-CUNNINGHAM, J. E.; MACDONALD, J. A. Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing glands Prestwich GD, Blomquist GJ (Ed.). In: **Pheromone biochemistry**. London: Academic Press, 1987 p. 27-75.
62. RASPOTNIG, G.; SCHICHO, R.; STABENTHEINER, E. et al. Morphology of female sex pheromone gland in the horse chestnut leafminer *Cameraria ohridella* (Lep., Gracillariidae). **J Appl Entomol**, v. 127, n. 3, p. 121-6, 2003.
63. MA, P. W.; ROELOFS, W. L. Sex pheromone gland of the female European corn borer moth, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae): ultrastructural and biochemical evidences. **Zoolog Sci**, v. 19, n. 5, p. 501-11, 2002.
64. FATZINGER, C. W. Bioassay, morphology, and histology of the female sex pheromone gland of *Dioryctria abietella* (Lepidoptera: Pyralidae (Phycitinae)). **Ann Entomol Soc Am**, v. 65, n. 5, p. 1208-14, 1972.
65. SRINIVASAN, A.; COFFELT, J. A.; NORMAN, P. et al. Sex Pheromone Gland Of The Navel Orangeworm, *Amyelois Transitella* (Lepidoptera: Pyralidae) Location, Bioassay And In Vitro Maintenance. **Fla Entomol**, v. 69, n. 1, p. 169-74, 1986.
66. DICKINS, G. The scent glands of certain Phycitidae (Lepidoptera). **Ecol Entomol**, v. 85, n. 14, p. 331-62, 1936.
67. SRINIVASAN, A.; COFFELT, J. A.; OBERLANDER, H. In vitro maintenance of the sex pheromone gland of the female Indian meal moth *Plodia interpunctella* (Hübner). **J Chem Ecol**, v. 5, n. 5, p. 653-62, 1979.
68. PERCY, J. E. Ultrastructure of sex-pheromone gland cells and cuticle before and during release of pheromone in female eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.)(Lepidoptera: Tortricidae). **Canadian journal of zoology**, v. 52, n. 6, p. 695-705, 1974.
69. RAINA, A. K.; WERGIN, W. P.; MURPHY, C. A. et al. Structural organization of the sex pheromone gland in *Helicoverpa zea* in relation to pheromone production and release. **Arthropod Struct Dev**, v. 29, n. 4, p. 343-53, 2000.
70. WEATHERSTON, J.; PERCY, J. Studies of physiologically active arthropod secretions. IV. Topography of the sex pheromone producing gland of the eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.)(Lepidoptera: Tortricidae). **Canadian journal of zoology**, v. 48, n. 3, p. 569-71, 1970.

71. LÖFSTEDT, C.; WAHLBERG, N.; MILLAR, J. Evolutionary patterns of pheromone diversity in Lepidoptera. Allison JD, Cardé RT (Ed.). In: **Pheromone communication in moths: evolution, behavior and application**. California: University of California Press, 2016 p. 43-78.
72. ANDO, T. Pheromone List for Lepidopterous. 2014. "Disponível em: < <http://www.tuat.ac.jp/~antetsu/LepiPheroList.htm> >. Acesso em: 23 Feb 2019.
73. EL-SAYED, A. M. The pherobase. 2018. "Disponível em: < <http://www.pherobase.com/> >. Acesso em: 2019
74. ANDO, T.; INOMATA, S.; YAMAMOTO, M. Lepidopteran sex pheromones. Schulz S (Ed.). In: **The chemistry of pheromones and other semiochemicals I Top Curr Chem**. Berlin: Springer, 2004. v. 239, p. 51-96.
75. KALINOVÁ, B.; JIROŠ, P.; ŽD'ÁREK, J. et al. GC×GC/TOF MS technique—A new tool in identification of insect pheromones: Analysis of the persimmon bark borer sex pheromone gland. **Talanta**, v. 69, n. 3, p. 542-7, 2006.
76. ANDO, T.; SAITO, O.; ARAI, K. et al. (Z)- and (E)-12-Tetradecenyl Acetates: Sex Pheromone Components of Oriental Corn Borer (Lepidoptera : Pyralidae). **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 2643-9, 1980.
77. GRANT, G.; PENDREL, B.; SLESSOR, K. et al. Identification of sex pheromone components for two Lepidopteran defoliators, the oak olethreutid leafroller, *Pseudexentera spoliata* (Clemens), and the aspen leafroller, *Pseudexentera oregonana* (Walsingham). **The Canadian Entomologist**, v. 123, n. 6, p. 1209-18, 1991.
78. ZHU, J.; RYNE, C.; UNELIUS, C. R. et al. Reidentification of the female sex pheromone of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*: evidence for a four component pheromone blend. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 92, n. 2, p. 137-46, 1999.
79. KRASNOFF, S. B.; VICK, K. W.; COFFELT, J. A. (Z,E)-9,12-Tetradecadien-1-ol: A component of the sex pheromone of *Ephestia elutella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). **Environ Entomol**, v. 13, n. 3, p. 765-7, 1984.
80. KUWAHARA, Y.; CASIDA, J. E. Quantitative analysis of the sex pheromone of several phycitid moths by electron-capture gas chromatography. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 681-4, 1973.
81. HEATH, R. R.; TEAL, P. E. A.; EPSKY, N. D. et al. Pheromone-based attractant-for males of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera : Pyralidae). **Environ Entomol**, v. 35, n. 6, p. 1469-76, 2006.
82. MA, T.; LI, Y.; SUN, Z. et al. (Z,E)-9,12-tetradecadien-1-ol: a major sex pheromone component of *Euzophera pyriella* (Lepidoptera: Pyralididae) in Xinjiang, China. **Fla Entomol**, v. 97, n. 2, p. 496-503, 2014.
83. BESTMANN, H.; KERN, F.; MELIKYAN, G. et al. Pheromones, 88 [1]. Sex pheromone components of female *Euzophera punicaella* M.(Lepidoptera, Pyralidae). **Z Naturforsch C**, v. 48, n. 1-2, p. 110-2, 1993.
84. JURENKA, R. A. Biosynthetic pathway for producing the sex pheromone component (Z,E)-9,12-tetradecadienyl acetate in moths involves a Delta 12 desaturase. **Cell Mol Life Sci**, v. 53, n. 6, p. 501-5, 1997.

85. ALLISON, J. D.; CARDÉ, R. T. Pheromones: reproductive isolation and evolution in moths. Allison JD, Cardé RT (Ed.). In: **Pheromone communication in moths: evolution, behavior and application**. California: University of California Press, 2016 p. 11-23.