

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

CRISTIANE CANUTO DOS SANTOS TAVARES

AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE FRUTOS DE *Annona squamosa* COM O FEROMÔNIO SEXUAL NA ATRAÇÃO DE MACHOS DE *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Depressaridae) E DA ATIVIDADE INSETICIDA DA CASCA DE *Genipa americana* SOBRE MACHOS E FÊMEAS DESTA ESPÉCIE

Maceió

2021

CRISTIANE CANUTO DOS SANTOS TAVARES

AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE FRUTOS DE *Annona squamosa* COM O FEROMÔNIO SEXUAL NA ATRAÇÃO DE MACHOS DE *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Depressariidae) E DA ATIVIDADE INSETICIDA DA CASCA DE *Genipa americana* SOBRE MACHOS E FÊMEAS DESTA ESPÉCIE

Tese apresentada o Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ruth Rufino do Nascimento

Maceió

2021

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

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

- T231a Tavares, Cristiane Canuto dos Santos.
Avaliação do efeito sinérgico dos compostos voláteis de frutos de *Annona squamosa* com feromônio sexual na atração de machos de *Cerconota anonella* (Lepidoptera: depressaridae) e da atividade inseticida da casca de *Genipa americana* sobre machos e fêmeas desta espécie / Cristiane Canuto dos Santos Tavares. – 2021.

110 f. : il., graf., tabs. color.

Orientadora: Ruth Rufino do Nascimento.

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

Bibliografia: f. 105-107.

1. Broca dos frutos das anonáceas. 2. Bioinseticida. I. Título.

CDU: 661.16.34.5



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



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **CRISTIANE CANUTO DOS SANTOS TAVARES** intitulada: “**AValiação DO EFEITO SINéRGICO DOS COMPOSTOS VOLáTEIS DE FRUTOS DE *Annona squamosa* COM O FEROMÔNIO SEXUAL NA ATRAÇÃO DE MACHOS DE *Cerconota anonella* (*Lepidoptera: Depressariidae*) E DA ATIVIDADE INSETICIDA DA CASCA DE *Genipa americana* SOBRE MACHOS E FÊMEAS DESTA ESPÉCIE**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 16 de dezembro de 2021, às 13h, por meio de videoconferência.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Ruth Rufino do Nascimento
Orientadora (PPQBIQB/UFAL)

Documento assinado digitalmente
gov.br Antonio Euzébio Goulart Santana
Data: 18/12/2021 21:53:47-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
(PPQBIQB/UFAL)

Profa. Dra. Iara Sordi Joachim Bravo
(PPQE/IB/UFBA)

Dr. João Gomes da Costa
(EMBRAPA)

Documento assinado digitalmente
gov.br Francis Soares Gomes
Data: 17/12/2021 07:42:26-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Francis Soares Gomes
(PPQBIQB/UFAL)

Aos meus pais, Benildo e Edna, pelas orações, incentivo e carinho. Aos meus irmãos, Ewerton e Crislâny, pelo companheirismo e apoio. Ao meu esposo, Enderson, e minha filha, Maria Eduarda, pelo ajuda e apoio e amor incondicionais.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela saúde, por toda força, coragem e sabedoria para trilhar esse caminho da melhor forma e concluir mais uma etapa importante da minha vida.

A Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante todo o período de desenvolvimento desse trabalho.

A Profa. Dra. Ruth Rufino do Nascimento, pela orientação, amizade, exemplo de profissionalismo, confiança, amizade durante o desenvolvimento desse trabalho.

A Profa. Daniela Navarro, e aos Profs. Paulo Millet e Francis Soares pela parceria durante algumas etapas de realização deste trabalho.

Ao técnico José Joubert de Alencar Gonçalves, por toda amizade e ajuda prestada.

Aos meus amigos Camila Chicuta, Regivaldo Melo e Andreia Carla pela amizade e pelos momentos de alegria. E a Keilane Cruz pela amizade e parceria.

A todos os companheiros do laboratório de Ecologia Química que estiveram ao meu lado durante toda a minha formação acadêmica: Rita de Cássia, Maxdouglass dos Santos, Claudinete Silva, Jeinny Christine, Raphael de Farias, Nathaly Costa, Luana de Lima, Luma Batista, Jéssica Lima, Rafael Augusto e Andreza Heloísa pela amizade, apoio e que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao técnico Aldy dos Santos, pela dedicação e apoio no trabalho de selagem das ampolas.

Ao meu pai, por todo incentivo e a minha mãe, por toda ajuda, conselhos e amor incondicional.

Aos meus queridos irmãos, que me ajudam sempre e verdadeiramente torcem por mim.

Ao meu amor, esposo, companheiro, amigo, ajudador, por todo apoio e carinho, por me ouvir sempre, por segurar minha mão nos momentos difíceis, por estar ao meu lado sempre, sem medir esforços para me ajudar.

À minha filha, razão pela qual tento ser melhor a cada dia, pelos abraços mais sinceros e sorrisos mais verdadeiros da minha vida.

“Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na casa do Senhor por longos dias.”

(Salmos 23:6)

RESUMO

Cerconota anonella é uma das pragas mais sérias em plantios comerciais de anonáceas, tais como pinha e graviola. Os estudos sobre a comunicação química desta espécie são escassos, não havendo nenhum registro de produtos oficialmente registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle de pragas e doenças em pinha e graviola. Assim, técnicas que visam capturar o inseto, por meio de atrativos específicos baseados em compostos voláteis que desencadeiam mudanças comportamentais no organismo receptor (semioquímicos), são objetos importantes das investigações científicas. Com a busca por produtos naturais, isentos de toxicidade e efetivos no controle de insetos praga, extratos, isolados de plantas e que apresentem atividade inseticida, também podem ser usados no controle de pragas e despertam grande interesse científico. Neste estudo, objetivou-se identificar os compostos voláteis liberados por frutos de pinha, no estágio maduro, que desencadeiam a atração de machos virgens de *C. anonella* e também obter formulações dos compostos sintéticos e suas respectivas misturas para bioensaios laboratoriais. Posteriormente, as misturas dos voláteis dos frutos de pinha foram testadas em combinação com o extrato feromonal de fêmeas de *C. anonella*. Os compostos voláteis que mediam a interação entre os machos de *C. anonella* e frutos de pinha, foram extraídos mediante o uso da técnica de aeração e analisados por Cromatografia Gasosa acoplada à Eletroantenografia (CG-EAG) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). Três compostos eliciaram atividade antenal em machos desta espécie: mirceno, β -ocimeno e linalol. Quatro misturas desses compostos sintéticos, em duas concentrações, M₁ (mirceno/ β -ocimeno/linalol), M₂ (mirceno/ β -ocimeno), M₃ (mirceno/linalol) e M₄ (β -ocimeno/linalol), foram formuladas em um biopolímero e empregadas em bioensaios comportamentais em laboratório em arena de vidro com machos virgens de *C. anonella*. Todas as misturas testadas eliciaram atração em machos, entretanto, apenas dois tratamentos, M₃ (1 μ L/mL) e M₄ (10 μ L/mL), apresentaram maior atratividade, diferiram estatisticamente do tratamento controle. Posteriormente, as misturas dos voláteis dos frutos foram adicionadas, separadamente, à dose do feromônio (na proporção de 1:1) para avaliação do efeito sinérgico do feromônio com os voláteis dos frutos. Constatou-se que houve potencialização da resposta atrativa quando as misturas M₁ e M₄ foram adicionadas ao extrato feromonal, apresentando diferença significativa quando comparados à atratividade do extrato feromonal sozinho. Por fim, foi avaliada a atividade inseticida do extrato da casca do tronco de *Genipa americana* sobre machos e fêmeas de *C. anonella*. Para tal, foi preparado o extrato bruto em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 da casca do caule da planta e inserido nas dietas das lagartas e dos insetos adultos e, os mesmos, foram mantidos em contato com a dieta ao longo de 7 dias. Assim, analisou-se a sobrevivência dos insetos. Para as lagartas, o extrato de *G. americana* não apresentou taxa de mortalidade satisfatória. Entretanto, na avaliação dos adultos, constatou-se que o extrato, nas três concentrações testadas, resultou na mortalidade dos insetos, entretanto, o extrato a 25% gerou uma taxa de mortalidade de 70% em 3 dias de observação. Os resultados desta pesquisa são promissores para o emprego de métodos alternativos para o controle de *Cerconota anonella*, conhecida como a broca-do-fruto das anonáceas.

Palavras-chave: broca dos frutos das anonáceas; sinergia; bioinseticida.

ABSTRACT

Cerconota anonella is one of the most serious pests in commercial plantations of anonaceae, such as custard apple and soursop. Studies on the chemical communication of this species are scarce, and there is no record of products officially registered with the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) for the control of pests and diseases in custard apple and soursop. Thus, techniques that aim to capture the insect, through specific attractants based on volatile compounds that trigger behavioral changes in the receiving organism (semiochemicals), are important objects of scientific investigation. With the search for natural products, free from toxicity and effective in the control of pest insects, extracts, isolated from plants which present insecticidal activity, can also be used in pest control, and arouse great scientific interest. The present study aim to identify the volatile compounds released by custard apple, in the ripe stage, which trigger the attraction of virgin males of *C. anonella* and also to obtain formulations of synthetic compounds and their respective mixtures for laboratory bioassays. Subsequently, the mixtures of volatiles from the pinecone fruits were tested in combination with the pheromonal extract of *C. anonela* females. The volatile compounds that mediate the interaction between the males of *C. anonella* and custard apple were extracted using the aeration technique and analyzed by Gas Chromatography coupled to Electroantennography (GC-EAG) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). Three compounds elicited antennal activity in males of this species: myrcene, β -ocimene and linalool. Four mixtures of these synthetic compounds, in two concentrations, M₁ (myrcene/ β -ocymene/linalool), M₂ (myrcene/ β -ocymene), M₃ (myrcene/linalool) and M₄ (β -ocimene/linalool), were formulated in a biopolymer and used in behavioral bioassays in laboratory in a glass arena with virgin males of *C. anonella*. All mixtures tested elicited attraction in males, however, only two treatments, M₃ (1 μ L/mL) and M₄ (10 μ L/mL), showed greater attractiveness, differing statistically from the control treatment. Subsequently, the mixtures of fruit volatiles were added separately to the pheromone dose (in a 1:1 proportion) to evaluate the synergistic effect of the pheromone with the fruit volatiles. It was found that there was a potentiation of the attractive response when the M₁ and M₄ mixtures were added to the pheromonal extract, showing a significant difference when compared to the attractiveness of the pheromonal extract alone. Finally, the insecticidal activity of the trunk bark extract of *Genipa americana* on males and females of *C. anonella* was evaluated. For this, the crude extract was prepared in Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, from the plant stem bark and inserted into the diets of caterpillars and adult insects, and they were kept in contact with the diet for a period of time 7 days. Thus, the survival of insects was analyzed. For caterpillars, the *G. americana* extract did not show a satisfactory mortality rate. However, in the evaluation of adults, it was found that the extract, in the three concentrations tested, resulted in insect mortality, however, the extract at 25% generated a mortality rate of 70% in 3 days of observation. The results of this research are promising for the use of alternative methods for the control of *C. anonella*, known as the annonaceae fruit borer.

Keywords: *Annona* fruit borer; synergy; biopesticide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Pinha (<i>Anona squamosa</i>)	20
Figura 1.2 Quantidade de pinha produzida no Brasil (em toneladas)	21
Figura 1.3 - Graviola	23
Figura 1.4 Quantidade de graviola produzida no Brasil (em toneladas)	24
Figura 1.5 <i>Cerconota anonella</i> na fase adulta	26
Figura 1.6 Orifícios abertos pela lagarta e fios de seda secretados por ela	27
Figura 1.7 Ciclo de vida da <i>Cerconota anonella</i>	28
Figura 1.8 Representação esquemática dos semioquímicos e suas subclasses	31
Figura 1.9 Ilustração do sistema de aeração	34
Figura 1.10 Esquema de um cromatógrafo gasoso	35
Figura 1.11 Esquema básico de um sistema de CG/EAG	38
Figura 1.12 Antenas, em forma de V, características de movimento de antenação	39
Figura 2.1 Armazenamento dos frutos infestados pela broca-do-fruto	54
Figura 2.2 Frutos brocados utilizados para a retirada das lagartas de <i>C. anonella</i>	55
Figura 2.3 Lagartas mantidas em dieta artificial em laboratório	55
Figura 2.4 Pupas de machos e fêmeas de <i>C. anonella</i>	56
Figura 2.5 Sistema de aeração para coleta dos constituintes voláteis de frutos de pinha	57
Figura 2.6 Dessorção dos constituintes voláteis adsorvidos no Tenax [®]	57
Figura 2.7 Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas	58
Figura 2.8 Cromatógrafo gasoso acoplado a eletroantenógrafo	59
Figura 2.9 Antena do inseto colocada entre dois eletrodos	60
Figura 2.10 Olfatômetro em Y acoplado à arena	61
Figura 2.11 Estrutura química dos compostos utilizados nos bioensaios	62
Figura 2.12 Identificação dos compostos EAG-ativos no extrato de pinha	64
Figura 2.13 Associação entre comportamentos observados e os tratamentos testados (Concentração de 1µL/mL)	65
Figura 2.14 Associação entre comportamentos observados e os tratamentos testados (Concentração de 10µL/mL)	66

Figura 2.15 Atratividade de machos virgens de <i>C. anonella</i> para as misturas (Concentração: 1µL/mL) frente ao extrato de pinha	67
Figura 2.16 Atratividade de machos virgens de <i>C. anonella</i> para os tratamentos (Concentração: 10µL/mL) frente ao extrato de pinha	68
Figura 3.1 Manutenção dos insetos	82
Figura 3.2 Obtenção dos extratos contendo o feromônio sexual	83
Figura 3.3 Olfatômetro em Y, acoplado à arena	84
Figura 3.4 Atratividade de machos virgens de <i>C. anonella</i> para a mistura	86
Figura 4.1 Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier das lagartas de <i>C. anonella</i> mantidas em dieta artificial com extrato da casca de <i>G. americana</i> a 25	101
Figura 4.2 Efeito deterrente do extrato da casca de <i>G. americana</i> a 25% sobre lagartas de <i>C. anonella</i> nos estágios T1, T2 e T3.	102
Figura 4.3 Parâmetros nutricionais de lagartas de <i>C. anonella</i> mantidas em dieta artificial contendo ou não (controle) extrato a 25% da casca de <i>G. americana</i>	103
Figura 4.4 Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de adultos de <i>C. anonella</i> mantidas em dieta artificial com diferentes doses do extrato da casca de <i>G. americana</i>	104
Figura 4.5 Efeito deterrente do extrato de casca de <i>G. americana</i> sobre adultos de <i>C. anonella</i>	105
Figura 4.6 Parâmetros nutricionais de adultos de <i>C. anonella</i> mantidos em dieta artificial preparada sem (controle) e com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (testemunha) e com extrato em diferentes doses da casca de <i>G. americana</i>	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Formulações testadas (tratamentos) formuladas em biopolímero	62
Tabela 3.1 Tratamentos testados formulados em biopolímero	84

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO 1:	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1 A CULTURA DE ANONÁCEAS	18
1.1.1 A cultura de Pinha	18
1.1.2 A cultura de Graviola	21
1.2 <i>Cerconota anonella</i>	24
1.2.1 Métodos de controle da Broca-do-fruto	27
1.3 A COMUNICAÇÃO QUÍMICA MEDIADA POR SEMIOQUÍMICOS	29
1.3.1 Interação planta-hospedeiro	31
1.4 A TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE COMPOTOS VOLÁTEIS (HEADSPACE DINÂMICO)	31
1.5 AS TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS	33
1.5.1 A Cromatografia Gasosa	33
1.5.2 A Eletroantenografia	36
1.6 BIOENSAIOS COMPORTAMENTAIS	37
REFERÊNCIAS	41
CAPÍTULO 2:	
FORMULAÇÕES SINTÉTICAS A PARTIR DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE FRUTOS DE PINHA (<i>Annona squamosa</i>) ATRAENTES PARA MACHOS VIRGENS DE <i>Cerconota anonella</i> (<i>Lepidoptera: Depressaridae</i>)	46
RESUMO	47
ABSTRACT	48
2.1 INTRODUÇÃO	49
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	51
2.2.1 Obtenção do material biológico	51
2.2.1.1 Frutos	51
2.2.1.2 Insetos	51
2.2.2 Extração de constituintes voláteis de frutos de <i>A. squamosa</i>	53
2.2.3 Dessorção dos constituintes voláteis dos frutos de <i>A. squamosa</i>	54

2.2.4	Identificação dos constituintes voláteis por CGxMS	55
2.2.5	Identificação dos compostos voláteis liberados por frutos de <i>A. squamosa</i> na atração de machos de <i>C. anonella</i> por (CG/EAG)	56
2.2.6	Obtenção das soluções e formulações dos compostos sintéticos	57
2.2.7	Bioensaios comportamentais	58
2.2.8	Análises estatísticas	60
2.3	RESULTADOS	61
2.3.1	Identificação de compostos eletrofisiologicamente ativos para machos virgens de <i>C. anonella</i>	61
2.3.2	Associação entre os comportamentos e os tratamentos utilizados	61
2.3.3	Atratividade de machos virgens de <i>C. anonella</i> para as misturas dos compostos EAG-ativos	63
2.4	DISCUSSÃO	66
2.5	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	71

CAPÍTULO 3:

	EFEITO SINÉRGICO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DOS FRUTOS DE PINHA COM O FEROMÔNIO SEXUAL NA ATRAÇÃO DE MACHOS DE <i>Cerconota anonella</i> (Lepidoptera: Depressaridae)	74
	RESUMO	75
	ABSTRACT	76
3.1	INTRODUÇÃO	77
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	79
3.2.1	Obtenção dos insetos	79
3.2.2	Obtenção de extratos de glândulas abdominais de <i>C. anonella</i>	79
3.2.3	Obtenção das formulações dos compostos voláteis sintéticos	80
3.2.4	Bioensaios comportamentais	81
3.2.5	Análises Estatísticas	82
3.3	RESULTADOS	83
3.3.1	Atratividade de machos virgens de <i>C. anonella</i> para as misturas dos compostos EAG-ativos em combinação com o feromônio sexual.	83
3.4	DISCUSSÃO	84

3.5 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	88
CAPÍTULO 4:	
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE INSETICIDA DA CASCA DO TRONCO DE <i>Genipa americana</i> SOBRE MACHOS E FÊMEAS DE <i>Cerconota anonella</i>	90
RESUMO	91
ABSTRACT	92
4.1 INTRODUÇÃO	93
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	95
4.2.1 Obtenção do material biológico	95
4.2.1.1 Casca de <i>Genipa americana</i> L.	95
4.2.1.2 Insetos	95
4.2.2 Extrato da casca de <i>G. americana</i>	95
4.2.3 Bioensaios	96
4.2.4 Análise estatística	97
4.3 RESULTADOS	98
4.3.1 Atividade do extrato da casca de <i>G. americana</i> sobre lagartas de <i>C. anonella</i>	98
4.3.2 Atividade do extrato da casca de <i>G. americana</i> sobre insetos adultos de <i>C. anonella</i>	98
4.4 DISCUSSÃO	100
4.5 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS	103
PRODUÇÃO CIENTÍFICA	106

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a terceira posição no ranking mundial de produção de frutas. China e Índia respondem pelo primeiro e segundo lugar, respectivamente. Nos quatro primeiros meses de 2021, as exportações brasileiras de frutas foram, aproximadamente, 20% superiores ao mesmo período de 2020, atingindo um faturamento de US\$ 323,7 milhões. As maiores áreas cultivadas com a fruticultura no Brasil encontram-se nas regiões Nordeste e Sudeste, as quais representam 52% e 26%, respectivamente da área plantada no país (FAO, 2021; VIDAL, 2021).

O plantio de anonáceas, especialmente, pinha (*Annona squamosa*) e graviola (*Annona muricata*) apresentou um aumento significativo nas últimas décadas, uma vez que, o mercado desfavorável para algumas frutas mais convencionais estimulou a procura dos fruticultores por espécies frutíferas de alto valor comercial nos mercados nacional e internacional (SOBRINHO, 2010).

A graviola pode ser consumida como fruta fresca, entretanto, é na forma de sorvete, suco e néctar que desperta um interesse maior no mercado consumidor. É considerada uma fruta típica para a industrialização, devido a sua polpa, que apresenta rico sabor e agradável aroma. Além disso, o fruto imaturo também pode ser consumido cozido, assado ou frito. A pinha é considerada uma fruta exótica e sua produção vem aumentando nos últimos anos, no entanto, é pouco utilizada pela indústria de sucos e polpa de fruta, devido ao escurecimento da polpa, após o processamento. Essa anonácea apresenta frutos de sabor agradável, sendo rica em minerais e vitaminas (NOGUEIRA, 2002; CORDEIRO et al, 2000).

A broca-do-fruto, *Cerconota anonella* (Sepp, 1830) (Lepidoptera: Depressaridae), é considerada uma das mais sérias pragas, devido aos danos expressivos que causa à cultura das anonáceas. Esta praga ocorre em países da América Latina, principalmente na Venezuela e no Brasil (SOBRINHO, 2010).

Após o ataque deste inseto fitófago, os frutos apresentam apodrecimento da polpa e, a parte atacada torna-se endurecida e enegrecida, reduzindo seu valor comercial e tornando-os impróprios para o consumo *in natura* ou para o processamento industrial. Além de depreciar a qualidade do fruto, a praga *C. anonella* facilita a entrada de vários organismos oportunistas no interior do fruto, além de afetar as flores e os botões florais impedindo assim, a reprodução dos frutos (MICHELETTI et al., 2001).

O ensacamento dos frutos é uma técnica cultural utilizada para proteger os frutos de pinha e graviola contra o ataque de insetos-praga. Apesar do surgimento dos inseticidas e da redução

da mão de obra familiar, esta técnica tem sido mais empregada pela exigência do mercado por alimentos com níveis reduzidos ou isentos de agrotóxicos (PEREIRA, 2009; BRITO, 2010).

A principal estratégia de controle da broca-do-fruto é o controle químico, embora não haja agrotóxicos registrados para esta cultura de anonáceas. Esta técnica vem sendo realizada de forma preventiva, desde o momento em que são observados os primeiros sinais de ataque até a maturação dos frutos. Entretanto, não é tão eficiente quando a lagarta de *C. anonella* já se encontra instalada no interior do fruto. Todavia, o uso de pesticidas tende a ser reduzido cada vez mais devido ao impacto ambiental que os mesmos podem causar (OLIVEIRA et al., 2017).

Como não existem produtos oficialmente registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle de pragas e doenças em pinha e graviola, técnicas que visem à captura destes insetos do ponto de vista específico, são extremamente importantes, no que se refere à utilização de compostos não tóxicos, em baixas quantidades e concentrações que pode ser instalado na forma de formulações de fácil manuseio para o produtor. Além disso, o princípio é 100% ecológico, pois são substâncias produzidas e utilizadas pelo próprio inseto e dessa forma agem especificamente sem interferir em organismos não alvos (AGROFIT, 2020; VILELA; DELLA LUCIA, 2001).

Semioquímicos são substâncias químicas mediadoras da comunicação entre os seres vivos, intra- e interespecificamente. Os semioquímicos possuem um papel importante na agricultura, especialmente, no manejo de insetos-praga e sua utilização tem diminuído e, em alguns casos, até eliminado a uso de inseticidas. Enfatizando o uso de feromônios e de voláteis de plantas, os semioquímicos podem ser aplicados com diversas finalidades, sejam elas, monitoramento, captura massal ou interrupção de acasalamento (EMBRAPA, 2004).

Assim como os semioquímicos, a variedade de compostos vegetais que podem ser utilizados no controle de pragas aumentou nas últimas décadas apresentando diversos efeitos de repelência, inibição alimentar, regulação de crescimento e de atividade ovicida/larvicida/adulticida (MACEDO et al., 2007; COELHO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar quais compostos, presentes em frutos de pinha, são responsáveis pela atração de machos virgens de *C. anonella* e se, em combinação com o feromônio sexual, esses compostos potencializam a resposta atrativa destes machos. Para tanto, foram realizados testes eletrofisiológicos e bioensaios laboratoriais. Por fim, o trabalho também propôs a avaliação inseticida do extrato da casca do tronco de *Genipa americana* contra machos e fêmeas desta espécie através de testes de sobrevivência e deterrência alimentar.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A CULTURA DE ANONÁCEAS

A família Annonaceae, com nome genérico anonácea, é composta aproximadamente de 120 gêneros e possui cerca de 2.300 espécies, as quais estão classificadas em quatro subfamílias: Ambavioideae, Anaxagoreoideae, Annonoideae e Malmeoideae. No Brasil, estão representadas todas as subfamílias da atual classificação, onde ocorrem 386 espécies, distribuídas em 29 gêneros (SOBRINHO, 2010; CHATROU et al., 2012; MAAS et al., 2015).

Dentre as anonáceas, três gêneros são importantes: *Rollinia* sp, *Alberonia* sp e *Annona* sp. No gênero *Rollinia*, as principais espécies cultivadas são: *Rollinia silvatica* (araticum-do-mato), *Rollinia mucosa* (biribá) e *Rollinia escaibida* (araticum ou quaresma). No gênero *Alberonia* tem-se: *Alberonia purpuracea* (marolo), *Alberonia lanceolata* (pindaíba) e no gênero *Annona*, as principais espécies cultivadas nas regiões tropicais são: *Annona muricata* (graviola), *Annona squamosa* (pinha) e *Annona reticulata* (fruta-da-condessa). Para as regiões subtropicais, as espécies *Annona cherimola* (cherimólia) e o híbrido *Annona cherimola* x *Annona squamosa* (atemóia) (MOSCA et al., 2006).

A partir da década de 1980, a demanda de mercado para a pinha e a graviola começou a crescer. Neste período, somente quatro estados da região Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará e Pernambuco) e um da região sudeste (São Paulo) possuíam uma significativa produção de pinha. Na década seguinte, a graviola despontou nos mesmos Estados nordestinos como uma alternativa interessante para a agroindústria de polpas congeladas e de outros produtos industrializados. Seu cultivo expandiu-se então para outras regiões do Brasil e passou a ser uma opção promissora para pequenos produtores (LEMOS, 2014).

1.1.1 A cultura de pinha

A pinha (**Figura 1.1**), também chamada de fruta-do-conde ou ata (*Annona squamosa*, L.), tem origem na América tropical, mais especificamente, na Ilha de Trindade e nas Antilhas. Foi introduzida no Brasil em 1626 pelo Conde de Miranda, em função disso, passou a ser conhecida popularmente, em grande parte do país, como fruta-do-conde (KAVATI, 1992).

A pinheira apresenta importância econômica em países como Índia, Tailândia, Filipinas, Cuba e Brasil. No Brasil, a importância socioeconômica da pinheira tem aumentado nas últimas décadas, em razão de sua boa adaptação à baixa umidade relativa do ar. Como outras fruteiras tropicais, a pinheira é uma planta de multiuso decorrente de seu valor nutricional. Seu cultivo comercial ocorre com maior ênfase na região Nordeste e Centro-Oeste do país, devido a sua boa adaptação à baixa umidade relativa do ar (SÃO JOSÉ, 2014).

Figura 1.1 Pinha (*Anona squamosa*).



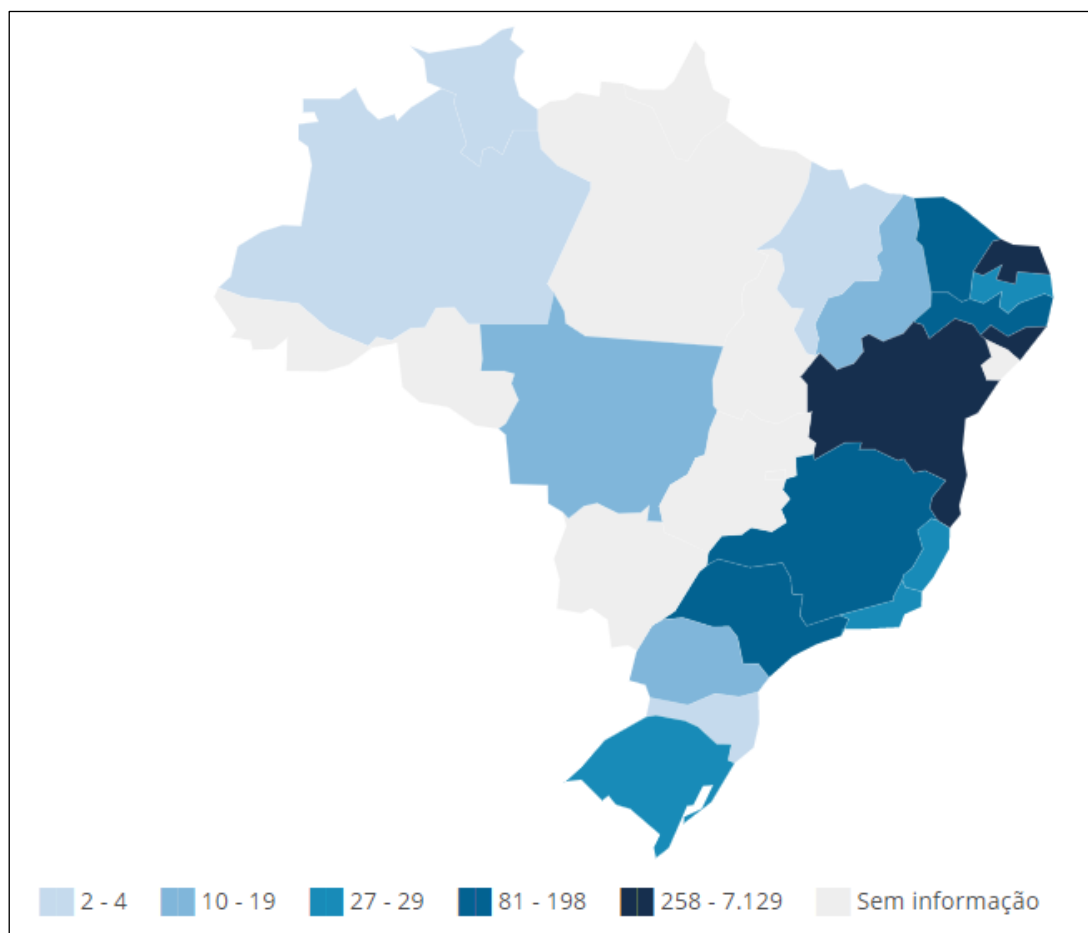
Fonte: AUTOR, 2021.

A cultura de pinha apresenta excelente adaptação às condições climáticas do litoral e do semi-árido do Nordeste brasileiro, regiões sem excesso de chuvas, com estação seca bem definida e altitude de até 800 m. Por ser considerada uma planta rústica, a pinheira cresce e produz nos diferentes tipos de solos. No entanto, para melhor desempenho, exige solos de boa profundidade, média a alta fertilidade e bem drenados, não suportando excesso de água em seu tronco (FILHO et al, 1998).

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

A produção de pinha no Brasil ocorre nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul e São Paulo (**Figura 1.2**). O estado da Bahia destaca-se como maior produtor nacional com mais de 82% de toda área colhida no Brasil, seguido dos Estados do Rio Grande do Norte e Alagoas (IBGE, 2019).

Figura 1.2. Quantidade de pinha produzida no Brasil (em toneladas).



Fonte: IBGE, 2019.

A depender da época do ano, os preços variam significativamente no Brasil, atingindo valores menores no primeiro semestre, quando a oferta é maior, e valores maiores no segundo semestre, quando a oferta cai bastante devido ao inverno nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil. Em geral, o consumo da pinha é *in natura*. Seu uso na agroindústria ainda é restrito (LEMOS, 2014; CORDEIRO et al, 2000).

De acordo com avaliação nas Centrais Estaduais de Abastecimento (CEASAS) de diversos Estados e na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), o preço médio da pinha no Brasil, entre os meses de dezembro de 2019 e janeiro de 2020, foi R\$ 6,78, sendo R\$ 7,50/kg em Alagoas; R\$ 7,00/kg no Rio Grande do Norte; R\$ 5,50/kg em Pernambuco, e R\$ 7,10/ kg em São Paulo. Esses preços são considerados satisfatórios, mas referem-se aos melhores frutos, bem formados e com peso superior a 250 g.

A pinheira é uma planta de porte baixo (4 a 6 metros) e muito ramificada, com folhas lanceoladas de coloração verde brilhante. O fruto caracteriza-se por ser um sincarpo de forma arredondada, esférica ou cordiforme, de coloração esverdeada, constituído por muitos carpelos achatados dos quais se originam cada semente (em geral 68 sementes/fruto). Os frutos têm, em

média, de 5 a 10 cm de diâmetro e o peso varia entre de 200 e 400 g. A polpa é branca, doce, de odor suave, possui baixa acidez, sendo rica em sais minerais e vitaminas (MANICA, 1994; FERREIRA, 1997).

Em diversas partes da planta, como raízes, folhas, frutos e sementes são encontrados diferentes compostos químicos como acetogeninas, diterpenos, óleos essenciais, saponinas e alcalóides, que apresentam propriedades medicinais para diversas enfermidades. O extrato das raízes tem ação em processos de disenteria, depressão e doença da medula espinhal. O chá das raízes e folhas, por exemplo, tem ação purgativa e laxativa (CORDEIRO et al, 2000).

Na cultura da pinha, a colheita constitui uma das atividades mais trabalhosas, pois é feita manualmente, devido aos frutos serem muito susceptíveis a rachaduras. Devem-se evitar torções ao colhê-los, utilizando-se escadas, sacolas, tesouras e caixas para acondicioná-los. O ponto de colheita é determinado pela observação do afastamento dos carpelos e pela coloração verde-amarelada dos tecidos intercarpelares. A colheita prolonga-se por três a seis meses (CORDEIRO et al, 2000; FILHO et al, 1998).

Após a colheita, os frutos são classificados pelo estágio de maturação e pelo tamanho. Os frutos lesionados, defeituosos, muito maduros ou verdes são descartados ou separados para consumo doméstico (FILHO et al, 1998).

1.1.2 A cultura de graviola

A graviola (*Anona muricata*) (**Figura 1.3**) é originária das terras baixas da América Tropical, mais precisamente da América Central e vales peruanos. Os colonizadores espanhóis encontraram a fruta na região do Caribe e a distribuíram para outras áreas tropicais. No Brasil, foi introduzida pelos portugueses no século XIV. É conhecida como *soursop* nos países de língua inglesa e *guanábana* nos países de língua espanhola (PINTO & SILVA, 1995; RAMOS et al., 2001).

A gravioleira apresenta importância econômica em diversos países, como Venezuela, Colômbia, Porto Rico, Costa Rica, México, Panamá, Jamaica, Cuba, Espanha, Índia, Honduras, Guiana, Suriname, Brasil, Peru, Senegal e Cingapura (SÃO JOSÉ et al., 2014).

Figura 1.3 Graviola (*Anona muricata*).



Fonte: AUTOR, 2021.

No Brasil, a graviola é a segunda anonácea em área cultivada e em produção. De acordo com o Censo Agropecuário de 2017, a produção brasileira atingiu um pouco mais de 7,5 milhões de frutos sendo que, aproximadamente, 90% desse total foi produzido na região Nordeste. O valor da produção nacional no ano de 2017 superou R\$ 24 milhões com 2.760 hectares de área colhida (IBGE, 2019).

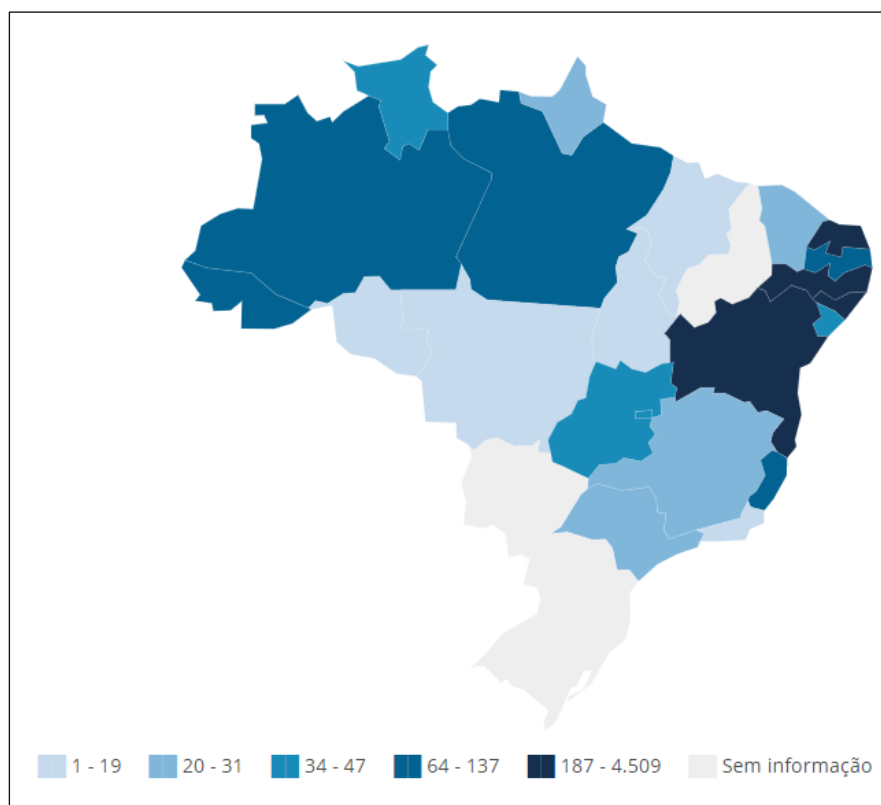
O Estado da Bahia é o maior produtor do país e a receita apenas para este Estado superou R\$ 15 milhões. Além da Bahia, a graviola é largamente cultivada em zonas de baixas altitudes nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Destacam-se como grandes produtores os estados de Pernambuco, Alagoas, Rio Grande do Norte, Espírito Santo, Pará, Amazonas, Paraíba, Acre e Distrito Federal (**Figura 1.4**) (IBGE, 2019).

Na região sudeste, o estado de São Paulo é o principal centro de comercialização. No ano de 2017 foram comercializadas 913,27 toneladas de graviola. Cerca de 77% desse total são provenientes de dois municípios baianos: Guandú (67,22%) e Teolândia (10,40%), de acordo com dados da Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP, 2020).

Devido ao aumento da oferta ao longo dos últimos anos, os preços da fruta fresca têm variado bastante. De acordo com as CEASAS de diversos Estados, o preço médio do quilo da graviola, entre os meses de dezembro de 2019 e janeiro de 2020, foi de R\$ 5,04. Quando fresca obtém preços no mercado com grande variação, chegando a ser vendida nas zonas de produção de Pernambuco e Alagoas por produtores entre R\$ 4,00 /kg e R\$ 5,37/ kg. Já nas centrais de

abastecimento de São Paulo e Rio de Janeiro, os preços variam R\$ 6,00/kg e 7,00/kg, respectivamente.

Figura 1.4 Quantidade de graviola produzida no Brasil (em toneladas).



Fonte: IBGE, 2021.

A inclusão da graviola no rol de frutas tropicais brasileiras de aceitação comercial, em nosso país, é justificada pelo crescente interesse pela polpa da fruta, tanto pelos consumidores como pelas indústrias de sucos, sorvetes e doces. Em razão da boa aceitação da fruta pelo mercado, nacional e externo, atraído pelo sabor exótico e aroma singular, as perspectivas de expansão da área com a gravioleira são grandes (RAMOS et al., 2001; AGEITEC, 2020).

Na maioria das agroindústrias de polpa de frutas do Nordeste, a polpa de graviola é a quarta mais procurada, ficando atrás apenas das polpas de goiaba, maracujá e acerola. Apesar da venda de polpas de frutas estar concentrada no Nordeste pela maioria das empresas, o mercado tem conquistado demandas internacionais. Em 2015, uma empresa cearense iniciou acordos com outros países para exportar os sabores regionais mais procurados, como goiaba, maracujá, acerola, graviola e manga (DIÁRIO DO NORDESTE, 2019).

A gravioleira, quando adulta, atinge uma altura média de 4 a 8 metros com caule único e ramificação assimétrica. Possui hábito de crescimento ereto, sua raiz não é tão vigorosa e

profunda quanto à de outras fruteiras tropicais, como a da mangueira (*Mangifera indica L.*). O fruto é uma baga composta, ou sincarpo com peso que varia de 4 kg a 10 kg, a casca é verde-escuro quando os frutos estão imaturos e verde-clara quando estão no ponto de colheita. A casca possui pequenos espinhos com pontas arredondadas. A polpa é branca, assemelhando-se a algodão umedecido, é muito sucosa e ligeiramente ácida com sabor e odor acentuados. As sementes apresentam coloração preta e quando são retiradas do fruto, após alguns dias fora deste, tornam-se marrom escuro, marrom claro ou castanho (PINTO; SILVA, 1995; MELO, 2006; NETO, 2015; SANTOS FILHO et al., 2007).

Um dos maiores problemas para comercialização da fruta fresca é a alta perecibilidade da graviola. O tempo reduzido de prateleira e a distância dos mercados consumidores podem ocasionar relevantes perdas econômicas. Além desses, outros fatores como desuniformidade no tamanho e formato dos frutos dificultam a etapa de comercialização (ALVES et al., 1997).

A expansão do cultivo e mercado da graviola só será alcançada quando forem solucionados alguns dos mais sérios problemas enfrentados atualmente pelo produtor, que vão desde a adoção de novas tecnologias, visando o aumento da produtividade, até o controle integrado das pragas e doenças que comprometem significativamente a produção e depreciam a qualidade do fruto (AGEITEC, 2020).

1.2 *Cerconota anonella*

Apesar do crescente avanço, um dos fatores que limitam o cultivo de pinha e graviola são as pragas e doenças, que prejudicam tanto a planta como os frutos. A literatura cita graves doenças e diversas espécies de pragas potenciais para esta cultura. Dentre as doenças, destacam-se: podridão-de-raízes, cancro depressivo, antracnose, podridão-seca-dos-frutos, entre outras. As broca-do-tronco (*Cratosomos* sp.), broca-do-coleto (*Hellipus catagraphus*), broca-da-semente (*Bephratelloides pomorum*) e a broca-do-fruto (*Cerconota anonella*) são as pragas que causam maiores danos à cultura de pinha e graviola (SOBRINHO et al., 2011).

Dentre as técnicas de controle, a maioria dos produtores do Nordeste utiliza a aplicação direta de inseticidas sintéticos. A podridão, que por sua vez, causa a queda prematura dos frutos, é combatida com fungicidas (BROGLIO et al., 2001)

A broca-do-fruto é considerada uma das pragas mais importantes da cultura de anonáceas, devido aos danos causados ao fruto, danificando a polpa, e, conseqüentemente, reduzindo o seu valor comercial para o consumo *in natura* ou para o processamento industrial (SOBRINHO, et al. 1998).

A *Cerconota anonella*, quando adulta, é uma mariposa com hábito noturno de coloração branco-acinzentada (**Figura 1.5**). O macho possui, em média, 20 mm de envergadura e 8 mm de comprimento, a fêmea é um pouco maior, com, aproximadamente 25 mm de envergadura e 10 mm de comprimento. Nas asas, apresenta traços cinza-escuro, irregulares (BITTENCOURT, et al. 2007).

Figura 1.5 *Cerconota anonella* na fase adulta.



Fonte: AUTOR, 2021.

O período de pré-oviposição é de dois a três dias. A postura é feita sobre os frutos e em casos de altas infestações pode ocorrer nas brotações e nas flores. Os ovos possuem coloração esverdeada e cada fêmea pode depositar até 310 ovos. Após a eclosão, as lagartas abrigam-se entre as fendas naturais dos frutos e secretam fios de seda para servem para sua proteção e após 3 a 4 dias penetram no fruto. Quando estão completamente desenvolvidas podem atingir até 22 mm de comprimento e possuem coloração variando de tons rosados a marrom. O período larval dura, em média, 14 dias. (SOBRINHO, et al. 1998) (**Figura 1.6**).

Figura 1.6 Orifícios abertos pela lagarta e fios de seda secretados por ela.



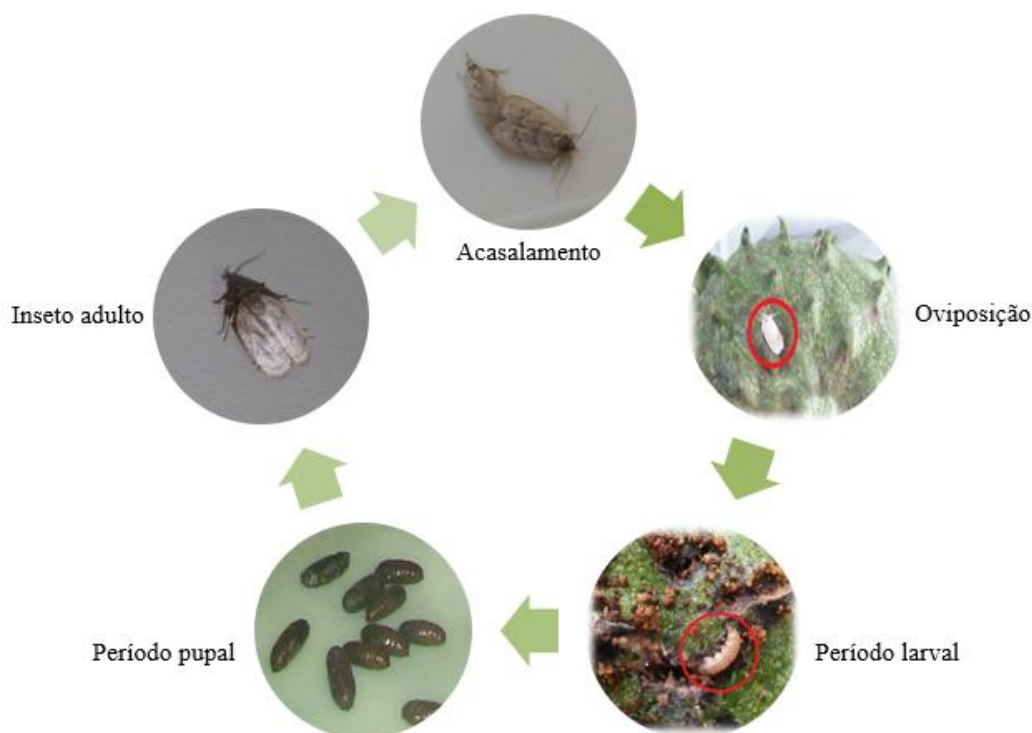
Fonte: AUTOR, 2021.

Com fragmentos de fios de seda e do próprio fruto, a lagarta constrói uma câmara saliente que se transforma em crisálida, de cor marrom. As lagartas podem empupar no próprio fruto ou no solo, o comprimento das pupas varia entre 8 a 10 mm. O período pupal dura aproximadamente 10 dias. Sendo assim, o ciclo de vida total pode chegar a 30 dias (**Figura 1.7**) (BITTENCOURT et al., 2007; SOBRINHO et al., 2011).

A fêmea efetua a postura sobre frutos de qualquer tamanho, e após a eclosão, a lagarta raspa a superfície para penetrar no interior do fruto. Durante o processo de alimentação, as lagartas destroem a polpa fazendo galerias que facilitam a entrada de fungos oportunistas, tais como *Lasiodiplodia theobromae* (podridão-seca-dos-frutos) e *Colletotrichum gloeosporioides* (antracnose) que penetram no fruto através de aberturas causadas pela lagarta e, ao atingir a polpa, desenvolvem-se rapidamente causando o escurecimento de toda a superfície do fruto (SOBRINHO et al., 1998; JUNQUEIRA et al., 2000).

A fêmea efetua a postura sobre frutos de qualquer tamanho, e após a eclosão a lagarta raspa a superfície para penetrar no interior do fruto. Durante o processo de alimentação, as lagartas destroem a polpa fazendo galerias que facilitam a entrada de fungos oportunistas, tais como *Lasiodiplodia theobromae* (podridão-seca-dos-frutos) e *Colletotrichum gloeosporioides* (antracnose) que penetram no fruto através de aberturas causadas pela lagarta e, ao atingir a polpa, desenvolvem-se rapidamente causando o escurecimento de toda a superfície do fruto (SOBRINHO et al., 1998; JUNQUEIRA et al., 2000).

Figura 1.7 Ciclo de vida da *Cerconota anonella*.



Fonte: AUTOR, 2021.

Os frutos atacados mostram-se retorcidos, com partes enegrecidas, endurecidas e com perfurações encobertas por um tipo de serragem caracterizada com excremento de digestão da lagarta. Esses fatores tornam os frutos impróprios para comercialização ou extração da polpa (SOBRINHO et al., 2011; MARTINEZ & GODOY, 1983).

1.2.1 Métodos de controle da Broca-do-fruto

Devido aos grandes danos causados pela broca-do-fruto, as culturas de pinha e graviola enfrentam algumas limitações no que se refere ao controle da praga, sendo assim, torna-se necessária a busca por novos resultados de pesquisas, além de experiências de sucesso em pomares comerciais. Com o objetivo de controlar a ação de *C. anonella*, três métodos de controle podem ser empregados, a saber: controle cultural, controle químico e controle biológico (FREITAS et al., 2013).

No controle cultural são realizadas inspeções semanais no pomar, coleta e queima dos frutos atacados. A utilização de armadilhas luminosas pode ser outro meio de controle (uma armadilha/ha), ou, ainda, pode-se realizar o consorciamento com culturas de ciclo curto, tais como: maracujá, mamão, feijão, milho, hortaliças, etc. Entretanto, um dos meios mais eficientes é o ensacamento dos frutos jovens com materiais plásticos ou telados. Segundo Brito e

colaboradores (2011), a estratégia de ensacamento resultou em frutos de graviola com melhor qualidade, menos injúrias, e maior possibilidade de retorno financeiro aos produtores.

O controle químico é feito através de pulverizações em inflorescências e frutos, pequenos e grandes, com inseticidas à base de triclorfon (0,10%), fenthion (0,075%), monocrotophos (0,05%), endossulfan (0,08%), com intervalo de 15 a 20 dias (LUNA, 1998).

Contudo, apesar de sua eficácia e ação rápida, o uso de produtos químicos vem sendo reduzido, pois, na maioria das vezes, ocasionam o desenvolvimento de populações resistentes do inseto, o aparecimento de novas pragas, ocorrência de desequilíbrio biológico e além do seu alto custo, causam grandes efeitos prejudiciais ao homem, a outros animais e ao meio ambiente. Sendo assim, faz-se necessário à busca de alternativas que minimizem os efeitos adversos dos inseticidas sintéticos (SILVA & BATISTA, 2016).

O controle biológico é um processo natural que constitui o controle de populações da praga com o uso de inimigos naturais. No estado de Alagoas, foram registrados alguns himenópteros atuando como parasitoides de *C. anonella*, a saber: *Apanteles* sp. e *Rhysipolis* sp. (Hymenoptera: Braconidae) e *Xiphosomella* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae). (MICHELETTI & BERTI-FILHO, 2000),

Embora o controle biológico destaque-se como um método seguro, permanente e econômico, algumas desvantagens podem ser observadas com o emprego deste método. O controle biológico pode levar muito tempo para ser colocado em prática, em decorrência das pesquisas e de outros processos de implementação, além de que, os resultados de uso do controle biológico não são tão rápidos como àqueles onde são utilizados os controles químicos (SILVA & BATISTA, 2016).

1.3 A COMUNICAÇÃO QUÍMICA MEDIADA POR SEMIOQUÍMICOS

Diante dos problemas dos métodos empregados atualmente no controle da broca-do-fruto, surge, então, a necessidade da utilização de outro meio de controle com o objetivo de manter as pragas abaixo do nível de dano econômico, de forma harmoniosa com o meio ambiente e o homem. O controle por comportamento ou controle comportamental é um método diferenciado baseado na comunicação química entre insetos e insetos-plantas (THOMAZINI, 2009).

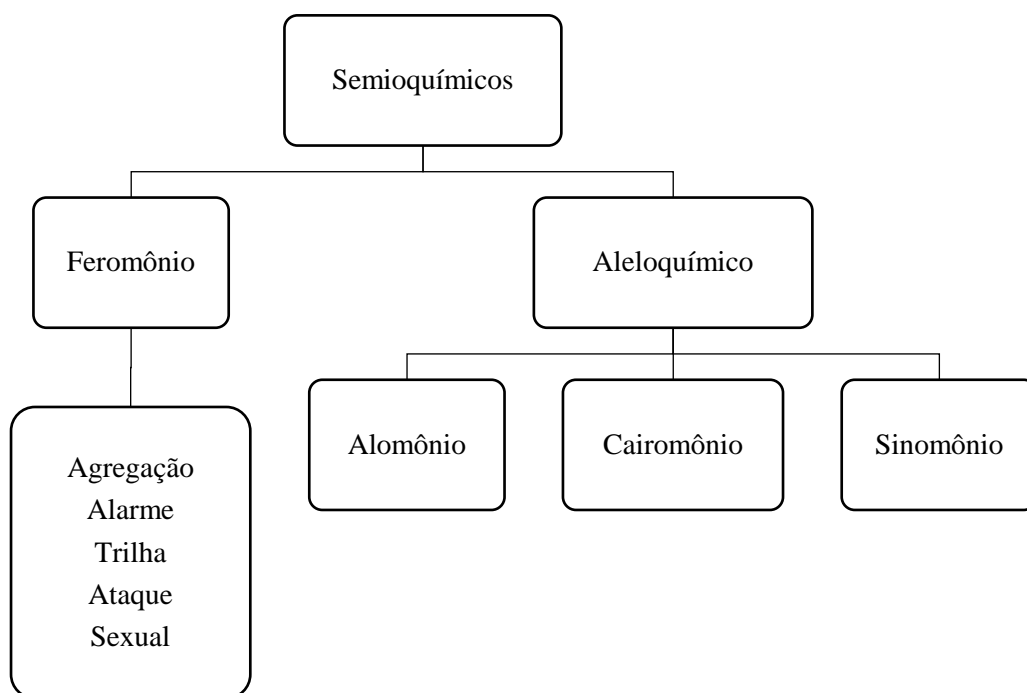
Os insetos utilizam sinais visuais, tácteis, auditivos, gustativos e olfativos como meios de comunicação. Os sinais olfativos são percebidos através de receptores químicos localizados

nas antenas do inseto. Esses receptores são constituídos por sensilas. Além das antenas, a recepção olfativa também pode ser realizada através de sensilas presentes nos palpos maxilares ou labiais. De forma geral, as sensilas são estruturas de paredes finas, perfuradas por poros que levam a uma cavidade na parede cuticular, através dos quais as ramificações dendríticas da célula sensorial são postas em contato com o ar. Os dendritos são envolvidos por um fluido onde ocorre a transformação da mensagem molecular em resposta bioelétrica que gera impulsos aos neurônios, axônios e em seguida ao cérebro (SCHNEIDER, 1969).

Os semioquímicos são substâncias químicas usadas na comunicação entre insetos e plantas. No contexto geral, os semioquímicos fornecem informações que provocam no receptor um comportamento ou uma resposta fisiológica. Os odores são de extrema importância na localização de presas, na defesa e agressividade, na corte e acasalamento, na seleção de plantas, na escolha de locais de oviposição, na organização das atividades sociais, entre outros comportamentos. A depender do seu modo de ação, são classificados como feromônios, quando agem entre organismos de mesma espécie, e aleloquímicos, quando atuam entre organismos de espécies diferentes (**Figura 1.8**) (NORDLUND & LEWIS, 1976; VILELA & DELLA LUCIA, 2001).

Os feromônios são substâncias químicas secretadas por um inseto que permite a comunicação com outro indivíduo da mesma espécie (efeito intraespecífico). Os feromônios atuam tanto no comportamento, como no desenvolvimento e na fisiologia dos insetos. São classificados de acordo com o resultado que podem provocar. Se apresentar um efeito de ação mais prolongada é conhecido como feromônio de efeito preparador, caso apresente um efeito de ação imediata é denominado feromônio de efeito desencadeador (NORDLUND & LEWIS, 1976; FERREIRA & ZARBIN, 1998; SILVA, 2004).

Figura 1.8 Representação esquemática dos semioquímicos e suas subclasses.



Fonte: Adaptado de PEREIRA, 2007.

Os feromônios de efeito desencadeador são classificados de acordo com o comportamento exibido pelos insetos, sendo os mais conhecidos: feromônio de agregação, empregado quando os insetos encontram um novo lugar para fazer moradia ou uma fonte de alimento; feromônio de alarme, que serve para avisar aos outros membros da colônia que um inimigo está se aproximando; feromônio de trilha, observado quando formigas deixam um rastro químico que só é detectado por outras formigas da mesma espécie; feromônio sexual, utilizado para atrair o parceiro para a cópula (NORDLUND & LEWIS, 1976; FERREIRA & ZARBIN, 1998).

Os aleloquímicos são semioquímicos produzidos por indivíduos de uma espécie que modificam o comportamento dos indivíduos de outra espécie (efeito interespecífico) e são classificados de acordo com as vantagens e desvantagens que conferem aos organismos envolvidos. Caso beneficie o organismo emissor do sinal químico é conhecido como alomônio, como é o caso de certas espécies de formigas onde as operárias produzem um jato de substâncias repelente a inimigos. Quando o benefício é do organismo receptor é denominado cairomônio, um exemplo disso é a procura de uma fêmea acasalada pelo local ideal para oviposição. Quando ambos os organismos envolvidos são favorecidos a interação é classificada como sinomônio. Como exemplos de sinomônios podem ser observadas as interações formiga-pulgão, polinizadores e odores florais e planta e parasitóide (BORGES, 2001; SILVA, 2004; THOMAZINI, 2009).

Os cairomônios têm sido empregados como maior intensidade no Manejo Integrado de Pragas (MIP) por influenciar, diretamente, o comportamento do inseto, tanto na seleção dos hospedeiros, como na escolha de locais de oviposição (SILVA, 2004).

O controle comportamental de insetos-praga é um dos pilares do Manejo Integrado de Pragas (MIP). Contudo, muitas vezes, as estratégias desenvolvidas para esse tipo de controle ficam somente dentro do âmbito acadêmico. Assim sendo, compreender o mecanismo dos insetos, as dinâmicas populacionais e as interações com o ambiente são bases fundamentais para um efetivo emprego do MIP. Novas maneiras de alterar o comportamento das pragas estão ganhando espaço, como com o uso de semioquímicos com armadilhas para agir como atrativos ou repelentes desses organismos (MATIOLI, 2021).

1.3.1 Interação planta-hospedeiro

Interações bi-tróficas (planta-herbívoro) têm sido alvo de estudos de vários pesquisadores. Neste tipo de interação, as substâncias liberadas naturalmente pelas plantas são detectadas por herbívoros que as usam como cairomônio (FERREIRA et al., 2001).

Na orientação olfativa de lepidópteros, os cairomônios, formam sinais sensoriais que definem um hospedeiro específico e fornecem informações para a escolha de sítios de alimentação, oviposição e local para encontro de parceiro sexual. Os sistemas receptores olfativos dos insetos permitem perceber alguns destes cairomônios das plantas que compilam um odor que atua como uma mensagem química. Embora exista uma vasta diversidade de odores no ambiente, este mecanismo de percepção é altamente específico a substâncias bioativas (ARX et al., 2011).

1.4 A TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS (HEADSPACE DINÂMICO)

Existem vários métodos e técnicas para extrair semioquímicos, entretanto, a metodologia empregada vai depender do material em estudo e da disponibilidade dos equipamentos adequados. Na extração de substâncias ativas de insetos e plantas, além dos fatores químicos, deve-se considerar também o ritmo biológico dos mesmos. Por exemplo, no caso de feromônios sexuais, estes são produzidos por insetos sexualmente maduros e, geralmente, em um determinado período do dia. No caso das plantas, a extração deve ser feita no estágio de maturação adequado (VILELA & DELLA LUCIA, 2001).

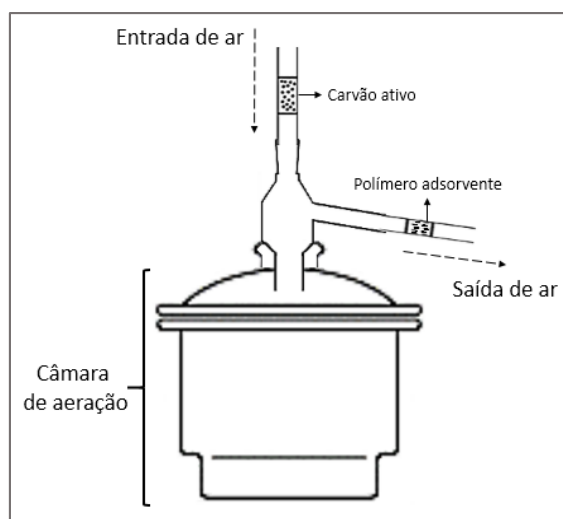
A extração de semioquímicos depende das propriedades químicas e físicas dos compostos, da concentração presente no ar, da umidade relativa e da temperatura, entre outros. Existem diferentes métodos para a extração de compostos voláteis, os quais, de um modo geral, podem ser classificados em métodos com e sem pré-concentração do analito. Os recipientes mais usados são confeccionados em polímero, vidro ou aço inoxidável (PARREIRA & CARDEAL, 2005).

A técnica de *headspace* dinâmico, também conhecida como aeração, é um processo que envolve a passagem do fluxo constante de ar pré-filtrado com carvão ativo (com a finalidade de remover as impurezas presente no ar) por uma câmara de aeração que contém as plantas analisadas. Ao entrar na câmara, o ar pré-filtrado carregará todos os compostos voláteis liberados pelas plantas até um tubo coletor, conhecido como *trap*, que contém um material adsorvente, existente na outra saída da câmara (**Figura 1.9**). Os semioquímicos podem ser coletados em materiais adsorvente sólidos, tais como: carvão ativo, sílica gel, e polímeros porosos (Tenax®, Porapak Q) (ZARBIN et al., 2001).

Uma das principais características de um adsorvente é a quantidade de substância que pode ser acumulada ou que pode ser retirada da sua superfície. Os polímeros, constituídos de poliestireno, ésteres poliacrílicos ou resinas fenólicas, são usados mais frequentemente (FREIRE et al., 2008).

O carvão ativo, por sua vez, é um material formado por cadeias de carbono em cujas extremidades são encontrados elementos como o oxigênio e o hidrogênio. É obtido a partir de carbonização em atmosfera inerte de materiais como madeira, casca de coco, bagaço de cana de açúcar, palha de milho, casca de arroz, entre outros, e, em seguida realiza-se tratamento térmico e/ou químico. A ativação baseia-se na retirada de resíduos orgânicos, resultando em uma forma de carvão mais poroso e, por isso, com maior área superficial. O caráter não polar da superfície no carvão ativado é fator preponderante na adsorção de moléculas não polares (MINURA et al., 2010; GUILARDUCI et al., 2005)

Figura 1.9 Ilustração do sistema de aeração.



Fonte: AUTOR, 2021.

O carvão ativo, por sua vez, é um material formado por cadeias de carbono em cujas extremidades são encontrados elementos como o oxigênio e o hidrogênio. É obtido a partir de carbonização em atmosfera inerte de materiais como madeira, casca de coco, bagaço de cana de açúcar, palha de milho, casca de arroz, entre outros, e, em seguida realiza-se tratamento térmico e/ou químico. A ativação baseia-se na retirada de resíduos orgânicos, resultando em uma forma de carvão mais poroso e, por isso, com maior área superficial. O caráter não polar da superfície no carvão ativado é fator preponderante na adsorção de moléculas não polares (MINURA et al., 2010; GUILARDUCI et al., 2005)

A dessorção dos compostos extraídos é feita com a utilização de pequenas quantidades de um solvente, como diclorometano, hexano e éter, com alto grau de pureza. Os materiais são coletados através da evaporação do solvente, sem que sejam expostos a altas temperaturas (ZARBIN et al., 2001).

1.5 AS TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

1.5.1 A Cromatografia Gasosa

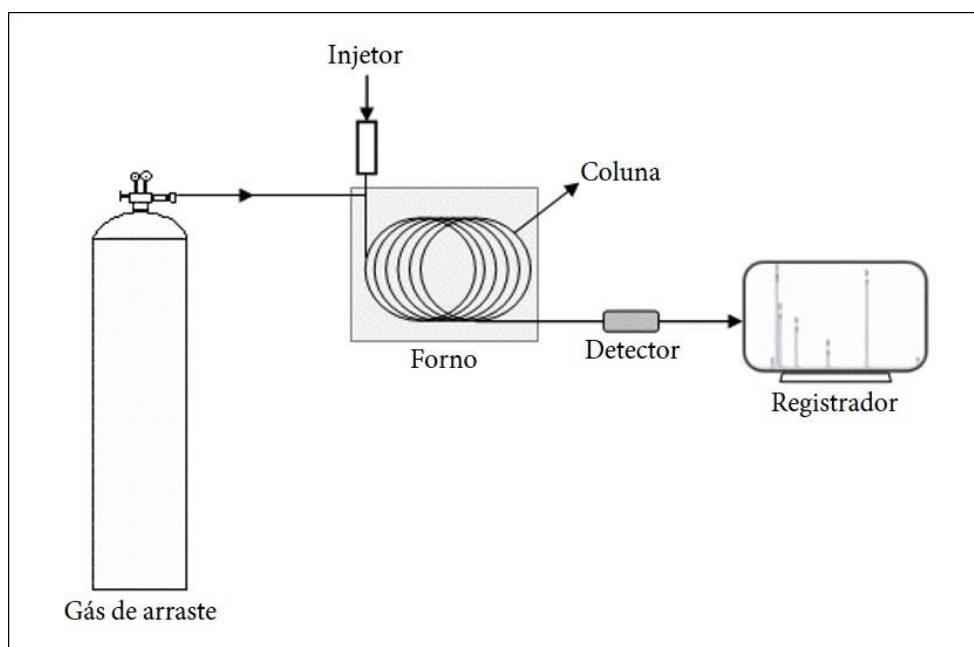
A cromatografia é um método físico de separação, onde os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases imiscíveis: uma fase fixa, denominada fase estacionária, e outra, denominada fase móvel. Na cromatografia gasosa a fase estacionária é um sólido de grande área superficial (carvão vegetal, sílica-gel ou peneira molecular). A adsorção dos componentes da mistura acontece de forma diferencial para cada constituinte e constitui a base da separação (LANÇAS, 1993).

Por possuir alto poder de resolução e ser muito eficiente devido à possibilidade de detecção em concentrações muito baixas (10^{-9} - 10^{-12} g), a cromatografia gasosa é uma das técnicas analíticas mais utilizadas. Entretanto, a limitação deste método é a necessidade de que a amostra seja volátil ou estável termicamente (DEGANI, 1998). Por esse fato, os compostos voláteis emitidos pelas plantas são amplamente isolados e identificados por cromatografia gasosa.

O principal mecanismo de separação da cromatografia gasosa (CG) baseia-se na partição dos componentes de uma amostra entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida (DEGANI, 1998).

O cromatógrafo gasoso é constituído basicamente por cinco partes (**Figura 1.10**).

Figura 1.10 Esquema de um cromatógrafo gasoso.



Fonte: AUTOR, 2020. Adaptado de CALZADA, 2020.

O gás de arraste tem a função de levar as moléculas da amostra até o detector, este deve ser inerte, ou seja, não pode interagir com a amostra, com a fase estacionária ou com as superfícies do instrumento. Os gases utilizados como fase móvel devem possuir alta pureza, os mais utilizados são: hidrogênio, nitrogênio e hélio. O injetor é a região onde é introduzida a amostra e também onde ocorre a vaporização do extrato, a injeção da amostra é feita através de microsseringas. A temperatura do injetor tem que ser elevada o suficiente para vaporizar todos os solutos instantaneamente, sem que haja decomposição térmica. A coluna, localizada no interior de um forno, é onde ocorre a separação dos constituintes da amostra. As colunas

utilizadas em CG são tubos longos de metais como aço ou cobre, vidro ou teflon, possuindo diâmetro de cerca de 3 mm e comprimento em torno de 30 m. A quarta parte do cromatógrafo gasoso é o detector. Ele é responsável pela captação de cada composto separado pela coluna. Existe mais de 50 tipos de detectores, sendo que, mais de 90% dos cromatógrafos gasosos são equipados com um dos seguintes detectores: condutividade térmica, ionização de chama, captura de elétrons ou espectrômetro de massas. Por fim, existe um registrador que registra os sinais emitidos pelo detector e os converte na forma de gráfico, as amostras são identificadas por seus tempos de retenção. O gráfico obtido é denominado cromatograma, e cada pico registrado corresponde a um composto, ou a uma mistura de isômeros racêmicos (DEGANI et al., 1998; SILVA, 2005; LANÇAS, 1993).

No cromatógrafo gasoso é necessário o controle da temperatura do injetor, da coluna e do detector. Como a temperatura é um fator de extrema importância, a programação de temperatura é feita em grande parte das análises por cromatografia gasosa, assim, pode-se obter melhor separação com picos mais simétricos em menor tempo (DEGANI et al., 1998).

Como foi dito, a cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas (CG/MS) relaciona as vantagens da espectrometria de massas, obtenção de informação estrutural e massa molar, com as vantagens da cromatografia, alta seletividade e eficiência de separação (CHIARADIA et al., 2008).

No espectrômetro de massas, as moléculas da amostra são convertidas a íons e frequentemente fragmentadas na fonte de ionização. Em seguida, os íons passam para o analisador onde são separados de acordo com a suas razões massa/carga. Por fim, os íons separados chegam a um detector de íons no qual produzem um sinal elétrico que é registrado e representado na forma de gráfico pelo sistema de dados (SKOOG et al., 2014).

Todo CG/MS possui uma biblioteca com espectros de massas de vários compostos. No software, o espectro de massa de um determinado pico é comparado com os da biblioteca. Por meio da similaridade entre os espectros, o sistema indica a provável estrutura do composto com um certo nível de probabilidade, realizando assim a sua identificação (JENSKE, 2016).

1.5.2 A Eletroantenografia

A eletroantenografia é uma técnica que usa como detector a antena do inseto. A antena do inseto é o órgão responsável pela captação e transmissão de estímulos olfativos. Ela é capaz

de discriminar uma mínima mudança do sinal químico, seja na composição, na isomeria ou na concentração do composto. Esse fato confere a antena uma excelente sensibilidade e especificidade (MORAES et al., 2008).

A eletroantenografia registra as mudanças na atividade fisiológica de um organismo através de impulsos elétricos. É registrada a soma das mudanças no potencial de numerosos neurônios receptores, que, quando estimulados, desencadeiam uma série de respostas simultâneas de várias células olfativas receptoras a um determinado odor. Para diferentes estímulos, cada célula possui sua própria especificidade e cada estímulo pode ser diferenciado pelo tamanho do impulso nervoso gerado (SCHNEIDER, 1969).

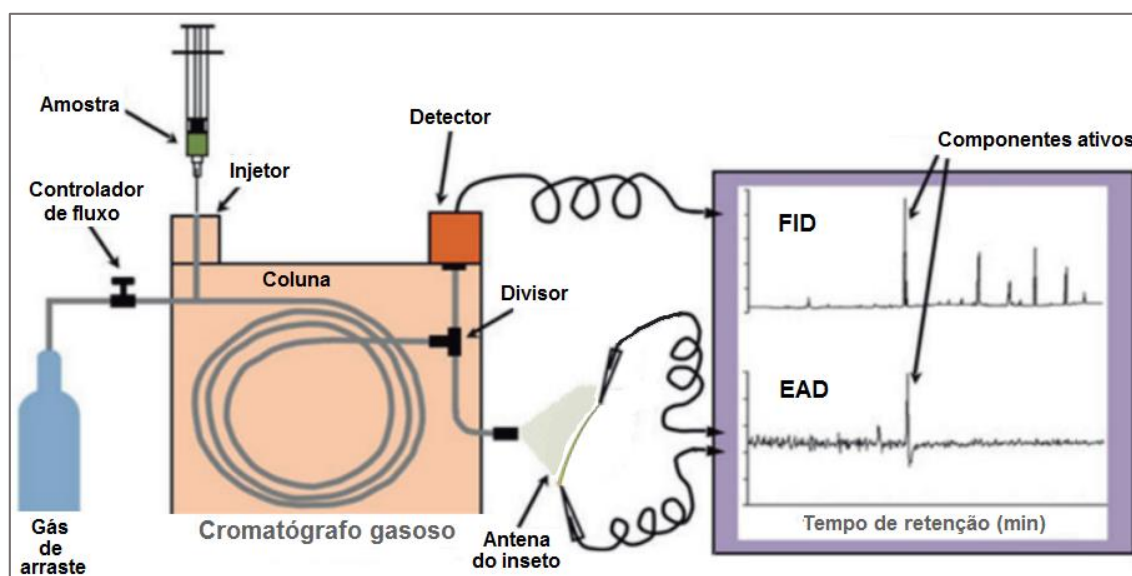
O funcionamento de um eletroanténógrafo é relativamente simples. O equipamento é constituído por uma fonte de estímulo, um mecanismo de circulação de ar, um controlador de durabilidade de estímulo, eletrodos de prata, ouro ou platina ligados ao amplificador e as informações recebidas são transferidas para um osciloscópio ou um computador. Para que as respostas eletroanténográficas sejam obtidas é necessário trabalhar com antena viva, para que esta seja capaz de transformar os estímulos químicos em impulsos elétricos. A antena é colocada em dois eletrodos, um funciona como “terra” e o outro tem o papel de registrador. Esta técnica pode analisar compostos puros de forma individual e extratos brutos com vários componentes, nesse caso a eletroantenografia é acoplada à cromatografia gasosa (FERREIRA et al., 2001).

O primeiro estudo eletrofisiológico foi realizado por Schneider (1957) empregando a antena da mariposa da seda, *Bombyx mori*, com o objetivo de medir a resposta da antena a voláteis do feromônio sexual da fêmea. A antena de um macho foi cortada e fixada entre dois eletrodos. A ponta da antena foi colocada no eletrodo de trabalho e a base foi fixada no eletrodo de referência. Uma solução salina foi utilizada para fechar o circuito e os eletrodos foram conectados a um osciloscópio. Quando a antena do macho recebeu um “puff” do feromônio sexual da fêmea, ocorreu a despolarização e uma deflexão negativa da voltagem foi medida no osciloscópio, 1-2 mV, acompanhado de um retorno à linha base. Com esse aparelhamento foi possível medir a atividade das substâncias puras para a antena da mariposa. No entanto, somente em 1969, Moorhouse e colaboradores acoplaram o eletroanténógrafo (EAG) ao cromatógrafo gasoso. O EAG, que apresenta alta sensibilidade e especificidade, acoplado ao cromatógrafo gasoso, que possui alta resolução na separação de misturas, permitiu a análise de misturas complexas obtidas de insetos e plantas (MORAES, et al. 2008).

Quando a amostra é injetada no cromatógrafo gasoso, percorre a coluna analítica para que as substâncias da mistura sejam separadas. Ao final da coluna, o eluente mistura-se com o

gás da linha de gás auxiliar e é dividido, igualmente, e enviado simultaneamente ao detector de ionização e chamas (FID) e ao eletroanténografo (EAG). Como as detecções são simultâneas é possível saber se determinado composto registrado pelo FID possui atividade biológica na antena do inseto (**Figura 1.11**). É necessário o uso de uma interface com temperatura controlada, ou seja, a temperatura da coluna analítica deve ser menor ou igual a temperatura da coluna que sai do cromatógrafo em direção à antena, desta forma, a condensação de substâncias na coluna capilar na linha de transferência da interface é evitada. (ZARBIN, 2001).

Figura 1.11 Esquema básico de um sistema de CG/EAG.



Fonte: Adaptado de Bradbury & Vehrencamp (2011).

1.6 BIOENSAIOS COMPORTAMENTAIS

A atividade biológica não é comprovada através de métodos químicos, sendo assim, experimentos que investigam o papel das substâncias em um contexto biológico, ecológico e/ou evolutivo são necessários. Testes demonstrando a atividade comportamental dos insetos diante de uma fonte de estímulo são essenciais para a compreensão completa da influência dos componentes químicos nos mecanismos comportamentais do inseto. Para isto, é necessário o monitoramento do comportamento do inseto através da observação visual e registro manual do pesquisador, esse monitoramento é realizado através de bioensaios comportamentais (LAUMANN et al., 2005).

Os ensaios biológicos comportamentais têm por objetivo quantificar e qualificar a resposta motora do inseto frente a uma fonte de estímulo. A resposta é quantificada pelo número

de insetos testados que respondem a um determinado odor (sinal químico) e qualificada pelos comportamentos exibidos relacionadas a essa percepção (VILELA & DELLA LUCIA, 2001).

As atividades comportamentais evidenciam a percepção do estímulo. Normalmente, iniciam-se com a antenação (antenas eretas em forma de V) (**Figura 1.12**), elevação de pronoto e vibração de asas, podendo, também, o inseto apresentar um comportamento de busca observado através de voo ou de caminhada em direção à fonte de odor (FERREIRA et al., 2001).

Figura 1.12 Antenas, em forma de V, características de movimento de antenação.



Fonte: AUTOR, 2021.

Os testes comportamentais podem ser realizados em laboratório, no campo ou em condições seminaturais (gaiolas de campo), onde as condições são próximas ao ambiente natural. A escolha do sistema mais apropriado depende da biologia e do comportamento do inseto em estudo, levando em consideração as características da amostra a ser testada. Os bioensaios mais comumente realizados em laboratórios utilizam três tipos básicos de equipamento: os olfatômetros, os túneis de vento e as arenas (PEREIRA, 2013).

Os olfatômetros podem apresentar uma grande variedade de aparelhos que podem ser adaptados em função das espécies de insetos a serem testados. Os mais sofisticados podem ser em forma de “Y”, com sistemas de liberação de odor e temperatura e umidade controlada, além da filtragem do ar no sistema. O túnel de vento pode ser definido como um meio ambiente artificial, com controle de velocidade de vento, temperatura e luz, onde estudos de orientação podem ser realizados por meio da observação direta ou gravados. As arenas são caixas transparentes de acrílico ou de vidro, onde o inseto é exposto, no seu interior, à fonte de estímulo. Como não há um fluxo de ar no interior da arena, os insetos manifestam apenas

resposta a curta distância e isso faz com que os bioensaios não tenham longa duração, pois os compostos encontram-se bem distribuídos, causando saturação das antenas dos insetos (HOWSE et al., 1998, EIRAS & MAFRA-NETO, 2001).

A maioria dos semioquímicos voláteis são muito instáveis devido a sua estrutura química, diante disto, é necessário o uso de formulações destes compostos com o objetivo de protegê-los da degradação causada por oxigênio e pela luz. Entretanto, a formulação deve assegurar a liberação controlada do sinal químico. Vários substratos de liberação foram desenvolvidos e três grupos podem ser citados: liberadores de matriz sólida, formulações líquidas para aerosol e reservatórios de formulação. Do ponto de vista histórico, o septo de borracha é o primeiro liberador descrito. A velocidade de liberação de uma molécula pode diferir significativamente de um liberador para outro (HEUSKIN et al., 2011).

Os liberadores de matriz sólida podem ser aplicados nas culturas ou nos pomares. Os semioquímicos são incorporados na matriz sólida e, a depender dos materiais utilizados na construção da matriz, a velocidade de liberação de uma molécula pode diferir significativamente de um liberador para outro (GOULART, 2012).

As formulações de liberação de aerosol são geralmente compostas de uma matriz líquida biodegradável, na qual os semioquímicos são dissolvidos. No entanto, outros componentes podem ser adicionados para proteger os semioquímicos como estabilizantes anti luz UV, antioxidantes e surfactantes (GOULART, 2012).

A preocupação ambiental associada ao alto potencial de ação dos polímeros, sem causar efeitos colaterais em nosso organismo, tem feito crescer o interesse pelos polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, como sistemas de liberação controlada de compostos biologicamente ativos. Os polímeros utilizados na confecção de sistemas de liberação controlada de moléculas bioativas podem ser de duas origens: natural ou sintética (GOULART, 2012).

REFERÊNCIAS

- AGEITEC. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. **Graviola**. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_mata_sul_pernambucana/arvore/CO NT000ffy4wqcyj02wx5eo05vmaqksdpvgam.html>. Acesso em 07 de janeiro de 2020.
- AGROFIT. **Agrofit: Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 02 dez. 2020.
- ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; MOSCA, J. L. Colheita e pós-colheita de anonáceas. In: SÃO JOSÉ, A. R. et al. (Ed.). **Anonáceas: Tecnologia de produção e comercialização**. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, p. 240-255. 1997.
- ARX. W. von; et al. Host plant volatiles induce oriented flight behaviour in male European grapevine moths, *Lobesia botrana*. **Journal of Insect Physiology** 57 (2011) 1323–1331.
- BITTENCOURT, M. A.L.; SOBRINHO, C. C. de M.; PEREIRA, M. J. B. Biologia, danos e táticas de controle da broca-da-polpa das anonáceas. **Bahia Agríc.**, v.8, n. 1, nov. 2007.
- BORGES, M. Os semioquímicos no controle de pragas e vetores de doenças. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 22. 2001.
- BRITO, E. A. **Flutuação populacional e avaliação de táticas de controle sobre a broca-do-fruto das anonáceas *Cerconota anonella* (Lepidoptera: oecophoridae)**. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.
- BRITO, E. A. et al. Efeito do ensacamento e pulverização de frutos de gravioleira, frente à broca-do-fruto das anonáceas, *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Oecophoridae). **Agrotropica**, v. 22, n. 3, p. 171-176, 2011.
- BROGLIO-MICHELETTI, S.M.F. et al. Controle de *Cerconota anonella* (Sepp.) (Lep.: Oecophoridae) e de *Bephratelloides pomorum* (Fab.) (Hym.: Eurytomidae) em frutos de graviola (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.722-725, 2001.
- CEAGESP. 2020. **Companhia de entrepostos e armazéns gerais de São Paulo**. Disponível em: <<http://www.ceagesp.gov.br>>. Acesso em: 07 jan. 2020.
- CEASA-PE. **Central Estadual de Abastecimento de Pernambuco**. Disponível em: <<http://www.ceasape.org.br/>>. Acesso em: 07 jan. 2020.
- CEASA-RJ. **Central Estadual de Abastecimento do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://www.ceasa.rj.gov.br/ceasa_portal/view/portal.asp>. Acesso em: 07 jan. 2020.
- CEASA-RN. **Central Estadual de Abastecimento do Rio Grande do Norte**. Disponível em: <<http://www.ceasa.rn.gov.br/>>. Acesso em: 07 jan. 2020.

CHATROU, L.W. et al. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 5-40, London, 2012.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte cromatografia associada à espectrometria de massa acoplada á espectrometria de massa na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, 623-636, 2008.

COELHO, M. B. et al. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 3, p. 406-414, 2007.

CORDEIRO, M. C. R.; PINTO, A. C. Q.; RAMOS, V. H. V. **O cultivo da pinha, fruta-do-conde ou ata no Brasil** – Planaltina: Embrapa Cerrados. 52p, 2000.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um Breve Ensaio. **Química Nova na Escola**. n. 7. 1998.

DIÁRIO DO NORDESTE. **Mercado de polpas de frutas expande negócios no exterior e no NE**. 2019. Disponível em: <<https://diariodonordeste.verdesmares.com.br/editorias/negocios/mercado-de-polpas-de-frutas-expande-negocios-no-externo-e-no-ne-1.2061239>>. Acesso em 07 de janeiro de 2020.

EIRAS, A.E.; MAFRA-NETO, A. Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento de insetos, p. 27-39. In VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, M.T. **Feromônios de insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas**. Ribeirão Preto, Editora Holos, 206p. 2001.

EMBRAPA. Semioquímicos: Alternativa biológica para o controle de pragas. **Cartilha Embrapa**, Brasília-DF. 2004.

FAO. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. **Divisão de estatística**. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en>>. Acesso em: 20 out. 2021.

FERREIRA, F.R. Germoplasma de Anonáceas. In: SÃO JOSÉ, A.R.; VILAS BOAS, I.; MORAIS, O.M.; REBOUÇAS, T.N.H., ed. **Anonáceas: produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimólia)**. Vitória da Conquista: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, p.36-41, 1997.

FERREIRA, J. T.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos: Editora da UFSCar, v. 3. Cap. 1, p. 9-21, 2001.

FERREIRA, J. T. B. ZARBIN, P. H. G. Amor ao primeiro odor. **Química Nova na Escola**, n. 7, 1998.

FILHO, G. C. de A. et al. Instruções técnicas para o cultivo da ateira. **Instruções técnicas**. Embrapa Agroindústria Tropical. No 01, 1-9, 1998.

FREIRE, M. T. da A. et al. Contaminantes voláteis provenientes de embalagens plásticas: desenvolvimento e validação de métodos analíticos. **Química Nova**. Vol.31, n. 6, São Paulo, 2008.

FREITAS, A. L. G. E. de. et al. Caracterização da produção e do mercado da graviola (*Annona muricata L.*) no estado da Bahia. **Informações Econômicas**, v. 43, n. 3, São Paulo, 2013.

GOULART, H F. **Desenvolvimento de feromônios para controle de pragas, novos caminhos de síntese, formulação, imobilização e liberação controlada**. Tese de Doutorado. Renorbio – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas. 2012. 157 f.

GUILARDUCI, V. V. S. et al. Adsorção de fenol sobre carvão ativado em meio alcalino. **Química Nova**. V. 29, n. 6, p. 1226-1232, 2005.

HEUSKIN, S. et al. The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.**, v. 15, n. 3, p. 459-470, 2011.

HOWSE, P. E.; JONES, O. T.; STEVENS, I. D. R. **Insect Pheromones and their Use in Pest Management**. 1st. London: Chapman e Hall. 345 p. 1998.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 15 out 2021.

JENSKE, G. **O que é Cromatografia?**, 2016. Disponível em: <<http://freitag.com.br/files/uploads/2017/08/Artigo-Grace.pdf>>. Acesso em: 16 de janeiro de 2020.

JUNQUEIRA, N. T. V. et al. **Controle de doenças da gravioleira no Serrado**. *Comum. téc., Planaltina*, n. 31, p.1-5, 2000.

KAVATI, R. O cultivo da atemóia. In: DONADIO, L.C.; MARTINS, A.B.G.; VALENTE, J.P. **Fruticultura tropical**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. p.39-70.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta. p. 2-10. 1993.

LAUMANN, R. A. et al. Software para análises de comportamento de insetos orientados a estudos de ecologia química. In: **Encontro Brasileiro de Ecologia Química**, Piracicaba 2005.

LEMOS, E. E. P. A produção de anonáceas no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 77-85, jan. São Paulo, 2014.

LUNA, J.V.U. **Fruticultura tropical: potencial brasileiro e desenvolvimento tecnológico**. Salvador: EBDA, 14p. 1988.

MAAS, P.J.M.; RAINER, H.; LOBÃO, A.Q. **Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB110572>>. Acesso em: 08 set. 2016.

MACEDO, M L R et al. Insecticidal action of Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 486-498, 2007.

MANICA, I. Taxonomia ou sistemática, morfologia e anatomia. In: MANICA, I., ed. **Fruticultura: cultivo das Anonáceas** (ata, cherimólia, graviola), Porto Alegre: UFRS, 1994 p.3-11.

MARTINEZ, N. B. de; GODOY, F. J. Enemigos naturales de *Cerconota anonella* Sepp. Perforador del fruto de la guanabana (*Annona muricata* L.) **Agronomia Tropical** 33, p. 155-161, 1983.

MATIOLI, T. F. **Manejo Integrado de Pragas (MIP): Controle Comportamental**. 2021. Disponível em: < <https://blog.chbagro.com.br/manejo-integrado-de-pragas-mip-controle-comportamental>>. Acesso em: 20 out 2021.

MELO, B. S. C. **Avaliação do potencial inseticida de produtos naturais e sintéticos no controle das brocas da graviola**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

MICHELETTI, S. M. F. B.; BERT-FILHO, E. Parasitóides de *Cerconota anonella* (Sepp, 1930) (Lep.: Oecophoridae) em Graviroleira (*Annona muricata*). **Scientia Agrícola**. 57 (3), p. 565-566. 2000.

MICHELETTI, A. M. F. B.; et al. *Controle de Cerconota anonella* (sepp.) (Lep.: Oecophoridae) e de *Bephratelloides pomorum* (fab.) (Hym.: Eurytomidae) em frutos de graviola (*Annona muricata* L.). **Rev. Bras. Frutic**, vol. 23 n. 3 Jaboticabal Dec. 2001.

MINURA, A. M.S.; SALES, J. R. C.; PINHEIRO, P. C. Atividades Experimentais Simples Envolvendo Adsorção sobre Carvão. **Química Nova na Escola**. Vol. 32, N° 1 , p. 53-56, 2010.

MOORHOUSE, J. E. et al. Method for Use in Studies of Insect Chemical Communication. **Nature**. V 223, 1174–1175, 1969.

MORAES, M. C. B. et al. **Eletrantenografia: a antena do inseto como um biossensor**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1 Ed, 22 p. 2008.

MOSCA, J. L; CAVALCANTE, C. L. B; DANTAS, T.M. **Características botânicas das principais Anonáceas e aspectos fisiológicos de maturação**. Embrapa Agroindústria Tropical, Doc. 106, Fortaleza- CE, 2006.

NETO, O. **Graviola auxilia no controle da depressão e no emagrecimento**. Campo Maior em Foco: Notícias da região dos Carnaubais, 2015. Disponível em: <<http://www.campomaioremfoco.com.br/imprimir.php?pg=noticia&id=46&imprimir=>>>. Acesso em: 08 dez. 2020.

NOGUEIRA, A. S. **Influência de épocas de poda e métodos de polinização na cultura da pinha (*Annona squamosa* L.) no norte do estado do Rio de Janeiro**. Dissertação de

Mestrado. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias - Universidade Estadual do Norte Fluminense. 68 p. 2002.

NORDLUND, D. A.; LEWIS, W. J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, Issue 2, p. 211–220, 1976.

OLIVEIRA, A. S et al. Efficacy of insecticides in fruit borer control and residues on sugar apple fruit. **Plant Protection • Rev. Ceres**. 64 (2), 2017.

OLIVEIRA, C.F.R. et al. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 498-504, 2011.

OLIVEIRA, L. P. S. et al. *Cerconota anonella* (Sepp., 1830) (Lepidoptera: Oecophoridae), a Principal praga da gravioleira. **Revista científica eletrônica da Agronomia**, n. 05, 2004.

PARREIRA, F. V.; CARDEAL, Z. L. Amostragem de compostos orgânicos voláteis no ar utilizando a técnica de microextração em fase sólida. **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p 646-654. 2005.

PEREIRA, L. G. B. Feromônios: Uma Alternativa no controle de insetos-praga. **Dossiê técnico**. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais/CETEC, 2007.

PEREIRA, M. C. T. Efeito do ensacamento na qualidade e na incidência da broca-do-fruto da atemoeira e da pinheira. **Bragantia**, Campinas. v. 68, n. 2, p. 389-396, 2009.

PEREIRA, P.D.M. **Influência de compostos voláteis herbívoro-induzidos de cana-de-açúcar, no comportamento de busca do parasitóide *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas, Brasil. 60p. 2013.

PINTO, A. C. de Q.; SILVA, E. M. da. **A cultura da graviola**. 1. Ed. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CPAC, 1995.

RAMOS, V. H. V.; PINTO, A. C. Q.; RODRIGUES, A. A. **Graviola. Produção: Aspectos Técnicos**. 1. Ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001.

SANTOS FILHO, A. L. **Germminação de sementes, estaquia e enxertia em gravioleira**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Centro de Ciência Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2007.

SAO JOSÉ, A. R. et al. Actuality and perspectives of Annonaceous in the world. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 2014.

SCHNEIDER, D. Insect olfaction: deciphering system for chemical messages. **Science**, 163, p. 1031-1037, 1969.

SCHNEIDER, W.C. Determination of Nucleic Acids in Tissues by Pentose Analysis. In: Colowick, S.P. and Kaplan, W.O., Eds., **Methods in Enzymology**, Academic Press, New York, 680-684, 1957.

SILVA, C. E. da. Estudo comparativo entre os constituintes voláteis liberados por machos *Ceratitidis capitata* e *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) e seus frutos hospedeiros preferencial *Averrhoa carambola* L. e secundário, *Carica papaya* L. Dissertação de mestrado. Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal da Alagoas, 2005.

SILVA, A. B. da; BATISTA, J. de. L. **Controle de insetos-praga: qual método é mais apropriado?** 2015. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/controle-de-insetos-praga-qual-metodo-e-mais-apropriado>>. Acesso em 19 de out. 2021.

SILVA, E. L. da. **Estudo das interações intra- e interespecífica das pragas das anonáceas, *Bephratelloides pomorum* Fab. (Hymenoptera: Eurytomidae) e *Cerconota anonella* Sepp. (Lepidoptera: Oecophoridae) e da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* Fab. (Lepidoptera: Crambidae) com seus hospedeiros.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Alagoas, Maceió: 145 p. 2004.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**, tradução da 9ª edição norte-americana. Ed. Thomson, 2014.

SOBRINHO, R. B. et al. **Identificação e monitoramento de pragas na produção integrada da gravioleira.** 1. ed. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.

SOBRINHO, R. B. Integrated production of Annonaceae in Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 102-107, 2014.

SOBRINHO, R. B. Potencial de exploração de anonáceas no Nordeste do Brasil. In: **Semana da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria**, 2010, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2010.

SOBRINHO, R. B. et al. Pragas da gravioleira. In: BRAGA SOBRINHO, R.; CARDOSO, J.E.; FREIRE, F. das C.O. **Pragas de fruteiras tropicais de importância agroindustrial.** Brasília: EMBRAPA-SPI/Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, p.132-141. 1998.

THOMAZINI, M. J. A comunicação química entre os insetos: obtenção e utilização de feromônios no manejo de pragas. In: GONCALVES, R. C.; OLIVEIRA, L. C. de (ed.). **Embrapa Acre: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia.** Rio Branco, AC: Embrapa Acre, cap. 17, p. 338-354. 2009.

VIDAL, M. de F. Produção comercial de frutas na área de atuação do BNB. **Caderno Setorial ETENE.** Ano 6, No 168, 2021.

ZARBIN, P. H. G.; VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. **Feromônios de Insetos: Biologia, Química e Aplicação.** Editora Holos, Ribeirão Preto, 2001.

CAPÍTULO 2

**EFEITO DE FORMULAÇÕES SINTÉTICAS DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE
FRUTOS DE PINHA (*Annona squamosa*) NA ATRAÇÃO DE MACHOS VIRGENS DE
Cerconota anonella (Lepidoptera: Depressaridae)**

RESUMO

Cerconota anonella é uma das pragas mais sérias em plantios comerciais de anonáceas, tais como pinha e graviola. Os estudos sobre a comunicação química desta espécie são escassos, não havendo nenhum registro de produtos oficialmente registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle de pragas e doenças em pinha e graviola. Assim, técnicas que visam capturá-lo, por meio de atrativos específicos baseados em compostos voláteis que desencadeiam mudanças comportamentais no organismo receptor (semioquímicos), são objetos importantes das investigações científicas. Neste estudo, compostos voláteis que mediam a interação entre os machos de *C. anonella* e frutos de pinha, no estágio maduro, foram extraídos pelo uso da técnica de aeração e caracterizados por Cromatografia Gasosa acoplada à Eletroantenografia (CG-EAG) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) a fim de desenvolver formulações atraentes para os machos coespecíficos. Os resultados obtidos demonstraram que três compostos: mirceno, β -ocimeno e linalol eliciaram atividade antenal em machos desta espécie. Quatro misturas desses compostos sintéticos, sendo uma mistura de três componentes e três misturas de dois componentes, M₁ (mirceno/ β -ocimeno/linalol), M₂ (mirceno/ β -ocimeno), M₃ (mirceno/linalol) e M₄ (β -ocimeno/linalol), foram formuladas em um biopolímero e empregadas em bioensaios comportamentais conduzidos em laboratório em arena de vidro com machos virgens de *C. anonella*. Todas as misturas testadas eliciaram atração em machos, entretanto, apenas dois tratamentos, M₃ (1 μ L/mL) e M₄ (10 μ L/mL), apresentaram maior atratividade de machos virgens de *C. anonella*, diferiram estatisticamente do tratamento controle. Os resultados desta pesquisa são promissores para o emprego das formulações testadas como iscas olfativas no monitoramento e captura de machos em pomares de pinha infestados com esta espécie no território brasileiro.

Palavras-chave: caiomônio, broca-do-fruto, formulações sintéticas.

ABSTRACT

Cerconota anonella is one of the most serious pests in commercial plantations of anonaceae, such as custard apple and soursop. Studies on the chemical communication of this species are scarce, and there is no record of products officially registered with the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) for the control of pests and diseases in custard apple and soursop. Thus, techniques that aim to capture it, through attractants based on volatile compounds that trigger behavioral changes in the organism's receptor (semiochemicals), are important objects of scientific investigations. In this study, volatile compounds that mediate an interaction between males of *C. anonella* and custard apple fruits, in the mature stage, were used through aeration and impact by Gas Chromatography coupled with Electroantennography (GC-EAG) and Gas Chromatography coupled with Spectrometry of Masses (GC-MS) an aim to develop attractive formulations for conspecific males. The results obtained demonstrate that three compounds: myrcene, β -ocimene and linalool elicited antennal activity in males of this species. Four synthetic compounds blends, including a three-component blend and three two-component blends, M1 (myrcene / β -ocimene / linalool), M2 (myrcene / β -ocimene), M3 (myrcene / linalool) and M4 (β -ocimene / linalool), were formulated in a biopolymer and used in behavioral bioassays conducted in a laboratory in a glass arena with virgin males of *C. anonella*. All mixtures tested elicited attraction in males, however, only two treatments, M₃ (1 μ L/mL) and M₄ (10 μ L/mL), showed greater attractiveness to virgin males of *C. anonella*, statistically differing from the control treatment. The results of this research are promising for the use of tested formulations as olfactory baits in monitoring and capturing males in custard apple orchards infested with this species in Brazilian territory.

Keywords: kairomone, fruit borer, synthetic formulations.

2.1 INTRODUÇÃO

Os semioquímicos liberados por plantas ou frutos hospedeiros desencadeiam diversas respostas comportamentais em insetos, de maneira tal, que os comportamentos específicos exibidos pelos insetos podem ser entendidos como resultado da ação específica dos semioquímicos das plantas ou frutos hospedeiros na fisiologia e no comportamento do inseto (REDDY & GUERRERO, 2004). Nesse contexto, os compostos voláteis mediadores das interações entre hospedeiro e inseto, nas quais o organismo receptor é beneficiado, são denominados de cairomônios (THOMAZINI, 2009).

Em insetos, a percepção dos cairomônios emanados pelo hospedeiro ocorre através do olfato, por intermédio das sensilas olfativas localizadas nas antenas. Assim, o sistema olfativo do inseto é extremamente sensível e está finamente equipado para reconhecer um hospedeiro específico em um ambiente natural, no qual inúmeros compostos voláteis estão presentes em diferentes concentrações e proporções (BRUCE & PICKETT, 2011).

Os cairomônios liberados por plantas e frutos hospedeiros afetam o comportamento reprodutivo de machos e fêmeas de lepidópteros, atuando como sinalizadores que orientam os machos virgens para os sítios de acasalamento, mesmo na ausência de feromônio sexual e as fêmeas acasaladas a encontrarem os locais adequados para oviposição. Deste modo, a percepção dos voláteis das plantas hospedeiras pode ser tão importante para os machos quanto para as fêmeas e, é provável que as mariposas fêmeas sejam encontradas em plantas hospedeiras que podem servir como locais de acasalamento, facilitando o encontro dos sexos (LANDOLT & PHILLIPS, 1997).

Cerconota anonella, também conhecida como broca-do-fruto, é considerada uma das pragas mais importantes da cultura de anonáceas, devido aos danos causados ao fruto, os quais comprometem a polpa, e, conseqüentemente, reduzem o seu valor comercial para o consumo *in natura* ou para o processamento industrial (SOBRINHO, et al. 1998).

Devido aos grandes danos causados pela broca-do-fruto, as culturas de pinha e graviola enfrentam algumas limitações no que se refere ao controle da praga, sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que objetivem entender o papel dos compostos voláteis liberados por frutos dessas culturas no comportamento reprodutivo deste inseto-praga.

A localização do hospedeiro é dada através da resposta olfatória para os odores liberados pela planta. Em algumas espécies de lepidópteros, a concentração de algum composto químico determina a preferência de fêmeas para potenciais plantas hospedeiras, entretanto, em outras

espécies, a proporção relativa dos compostos caracteriza a resposta da fêmea na busca pelo hospedeiro ideal (VISSER, 1986; RAMASWAMY 1988; FEENY et al., 1989).

Assim, técnicas que visem à captura seletiva destes insetos, empregando compostos voláteis que medeiam atração de adultos, são extremamente importantes, principalmente pelo uso de compostos específicos e não tóxicos, em pequenas quantidades e que podem ser formulados em substrato inerte que garanta a liberação lenta e gradual e facilite o manuseio dos compostos bioativos pelo produtor. É válido ressaltar que, para *C. anonella*, não existe nenhum estudo que descreva o papel dos voláteis de pinha na atração de machos (SOBRINHO et al., 2011; ARX et al., 2011; AGROFIT, 2020).

O presente estudo objetivou identificar os compostos voláteis, liberados por frutos maduros de *A. squamosa* que provocam despolarização em antenas de machos virgens de *C. anonella*, utilizando a Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector Eletroantenográfico (GC-EAD) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS), e avaliar a atratividade desses compostos em machos virgens em bioensaios laboratoriais. Uma vez comprovada a eficiência na atração de machos coespecíficos, as formulações testadas podem ser usadas em iscas olfativas com a finalidade de monitorar e controlar os danos causados por esta praga em pomares de pinha no território brasileiro.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Obtenção do material biológico

2.2.1.1 Frutos

Frutos infestados de *Annona muricata* (graviola) foram coletados em pomares, na Cooperativa Pindorama, localizada no município de Coruripe-AL, (10°09'54''S; 36°21'07''W). Após a coleta, foram levados para o laboratório de Ecologia Química na Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os frutos maduros e verdes, com sinais de ataque, foram armazenados em gaiolas de madeira (30 cm de largura x 30 cm de comprimento x 30 cm de altura) com as laterais cobertas por tela (**Figura 2.1**).

Figura 2.1 Armazenamento dos frutos infestados pela broca-do-fruto.



Fonte: AUTOR, 2021.

Frutos sadios de *Annona squamosa* (pinha) foram obtidos comercialmente e, no estágio maduro de maturação, foram utilizados na técnica de aeração para extração dos constituintes voláteis liberados pelos frutos.

2.2.1.2 Insetos

Os frutos brocados de *A. muricata* (graviola) (**Figura 2.2**), a partir do sétimo dia após a coleta, foram utilizados para a remoção das lagartas de *C. anonella*. Com o auxílio de luvas e pinças, as lagartas foram individualmente retiradas e mantidas em placas de Petri de acrílico contendo dieta artificial de realimentação, sendo mantidas em laboratório para criação até obtenção da fase de pupa (**Figura 2.3**). A dieta era composta dos seguintes ingredientes:

gérmen de trigo, cloridrato de colina, sais de Wesson, ácido ascórbico, farelo de soja, açúcar, nipagin, ácido sórbico, ágar-ágar, solução vitamínica, formol, ambrasinto, vita gold e água destilada (SILVA, 2012) (ANEXO 1).

Figura 2.2 Frutos brocados utilizados para a retirada das lagartas de *C. anonella*.



Fonte: AUTOR, 2021.

Figura 2.3 Lagartas mantidas em dieta artificial em laboratório.



Fonte: AUTOR, 2021.

No estágio de pupa, fêmeas e machos foram sexados com o auxílio do microscópio, baseado na presença de poro genital, presente em machos e, ausente em fêmeas. Em seguida, foram colocadas em placas forradas com algodão umedecido com água destilada e uma solução de sulfato de cobre a 1%, cobertas com papel filtro e mantidas em câmara de vidro (9 cm de

largura x 16 cm de comprimento x 9,5 cm de altura) devidamente etiquetadas, onde se encontrava um recipiente de vidro contendo solução de mel em água a 10% (**Figura 2.4**).

Figura 2.4 Pupas de machos e fêmeas de *C. anonella*.



Fonte: AUTOR, 2021.

Após a emergência dos adultos, fêmeas e machos virgens de *C. anonella*, foram colocados em câmaras de vidro (9 cm de largura x 16 cm de comprimento x 9,5 cm de altura) devidamente etiquetadas, onde se encontrava um recipiente de vidro contendo solução de mel em água a 10%. Os machos virgens foram utilizadas em posteriores bioensaios. Todo este procedimento ocorreu em sala climatizada ($24,1^{\circ}\text{C} \pm 1,2$ e $65\% \text{ UR} \pm 1,9$), com fotoperíodo invertido (12h:12h).

2.2.2. Extração de constituintes voláteis de frutos de *A. squamosa*

Para obtenção de extratos a partir de frutos de pinha, foi utilizada a técnica de aeração (**Figura 2.5**). Os frutos sadios (aproximadamente 1 kg), no estágio maduro de maturação, foram colocados em câmaras de aeração (22 cm de altura x 30 cm de diâmetro). A parte superior da câmara continha um tubo de vidro com carvão ativo que servia como filtro, para purificar o ar que entrava no sistema. Também na parte superior, existia outro tubo contendo um polímero adsorvente, neste caso, 150 mg de Tenax[®] com diâmetro poroso de 60-80 mesh, que tinha a função de adsorver as substâncias voláteis liberados pelos frutos. Uma bomba de ar foi conectada na parte superior do sistema e a corrente, com um fluxo constante de ar (0,5 L/min, que entrava passava no interior da câmara e seguia em direção ao tubo contendo o adsorvente (Tenax[®]). A aeração teve duração de 24 horas.

Figura 2.5 Sistema de aeração para coleta dos constituintes voláteis de frutos de pinha;



Fonte: AUTOR, 2021.

2.2.3 Dessorção dos constituintes voláteis dos frutos de *A. squamosa*

Os compostos voláteis liberados pelos frutos foram dessorvidos do adsorvente, Tenax[®], através da passagem de 2 mL de hexano (C₆H₁₂) bidestilado (grau HPLC) (**Figura 2.6**). Cada extrato foi dividido igualmente e armazenado em duas ampolas de 1 mL cada. Em seguida, as ampolas foram seladas, etiquetadas e mantidas em freezer (-5°C) para uso posterior nas análises químicas.

Figura 2.6 Dessorção dos constituintes voláteis adsorvidos no Tenax[®].



Fonte: AUTOR, 2021.

2.2.4 Identificação dos constituintes voláteis por CGxMS

Os constituintes químicos presentes nos extratos dos frutos de pinha e graviola foram identificados por meio de análises em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) da Agilent Technologies (7890ATM CG, Serie 5975C EM; Palo Alto, CA, USA) equipado com uma coluna capilar DB-5 da Agilent J&W (30 m × 0,25 mm d.i. × 0,25 μm de espessura do filme) (**Figura 22**).

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

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

Figura 2.7 Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas.



Fonte: AUTOR, 2021.

2.2.5 Identificação dos compostos voláteis liberados por frutos de *A. squamosa* na atração de machos de *C. anonella* por (CG/EAG)

Para identificar os compostos presentes nas amostras de aeração de pinha que funcionam como atraentes para machos de *C. anonella*, as análises eletrofisiológicas foram conduzidas no Laboratório de Ecologia Química, da Universidade Federal de Pernambuco, empregando-se um cromatógrafo gasoso (Trace GC Ultra; Thermo Scientific, Milão, Itália), equipado com uma coluna DB-5 (30m x 0,25mm i.d. x 0,25µm film, ValcoBond) e um detector de ionização em chamas (FID) acoplado a uma interface de detecção eletroantegráfica provida pela Syntech (Kirchzarten, Alemanha) (GC-EAG) (**Figura 2.8**).

Figura 2.8 Cromatógrafo gasoso acoplado a eletroantegráfico.



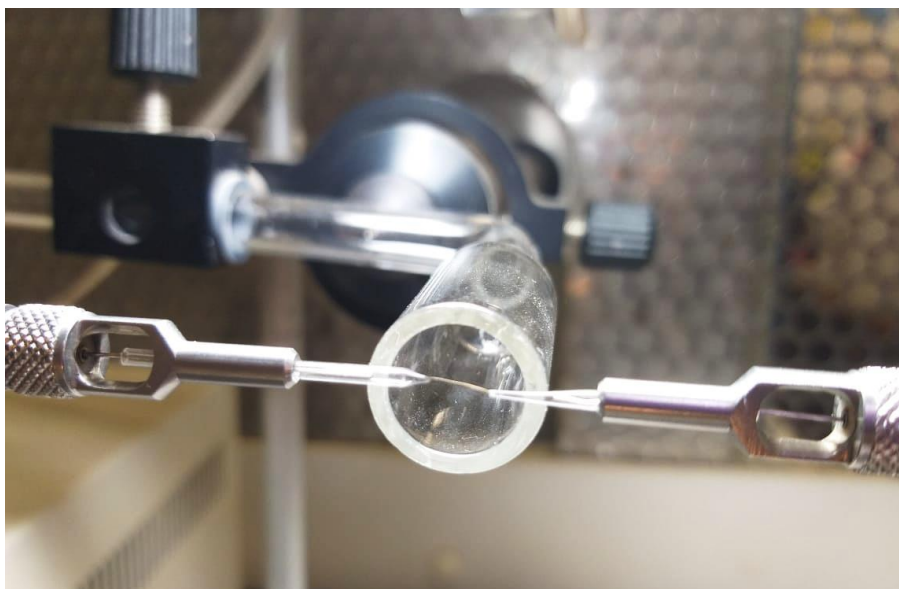
Fonte: AUTOR, 2021.

Uma alíquota das amostras (1,0 µL) foi injetada em cromatógrafo gasoso. Foram utilizados machos virgens com idade variando de 1 a 3 dias. A antena do inseto foi extraída com o auxílio de micro-tesoura, a base e a ponta da antena foram colocadas entre dois eletrodos capilares de vidro, preenchidos com solução de Ringer (8.0 g/L de NaCl, 0,4 g/L de KCl, 0,4 g/L de CaCl₂) ligado a fios de prata (**Figura 2.9**).

A análise ocorreu sob o modo *splitless* a uma temperatura de 150 °C. O forno do equipamento foi programado para operar a uma temperatura inicial de 40 °C, com velocidade de aquecimento de 6 °C/min até atingir a temperatura final de 200 °C. Durante o processo, o fluxo de gás de arraste, contendo os constituintes químicos separados na coluna, foi dividido em duas partes iguais: uma seguiu para a antena do inseto (detector antegráfico) e a outra

para o FID, ocorrendo o registro simultâneo das respostas de ambos os detectores ao material eluído da coluna. Um composto foi considerado EAG-ativo quando induziu despolarização na antena em, pelo menos, três dos seis indivíduos testados.

Figura 2.9 Antena do inseto colocada entre dois eletrodos.



Fonte: AUTOR, 2021.

2.2.6. Obtenção das soluções e formulações dos compostos sintéticos

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

Volumes de 10 μL de cada solução dos compostos individuais/mistura nas concentrações de 1,0 e 10,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ foram formulados em fracos tipo eppendorfs (10,7 mm de diâmetro x 39,5 mm de altura), contendo 0,01 g de microesferas de quitosana, com grau de

desacetilação de 65%, através da adsorção por contato durante um período de 24h, para garantir a evaporação do solvente. As formulações obtidas resultaram na dose 0,1 ng.

2.2.7 Bioensaios comportamentais

Para avaliar os comportamentos exibidos por machos de *C. anonella* diante dos compostos voláteis sintéticos, os bioensaios foram conduzidos no laboratório de Ecologia Química (UFAL) utilizando um olfatômetro do tipo “Y” de dupla escolha, durante a escotofase, entre 9:00 e 11:30 h com temperatura média de 26,2°C e umidade relativa média de 40%. Foram utilizados machos virgens de *C. anonella* com 1 a 3 dias de idade. Pelo fato dos bioensaios serem realizados no escuro, os mesmos foram conduzidos com auxílio de uma luz vermelha, para visualização do comportamento do inseto.

O olfatômetro em “Y” (15,7 cm de comprimento x 4,4 cm de altura) consiste de um tubo de vidro bifurcado, ao qual foi acoplado uma arena de acrílico (54 cm de comprimento x 25,8 cm de largura x 24,7 cm de altura) e uma bomba de ar. O ar que operou no olfatômetro foi purificado por meio de passagem por um filtro de carvão ativo (**Figura 2.10**).

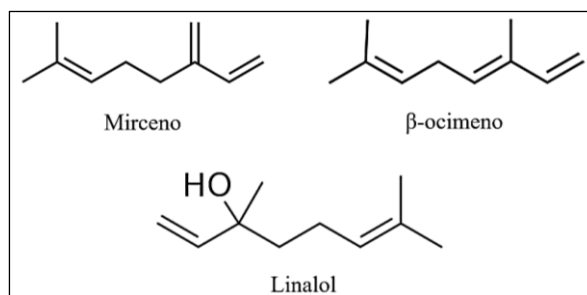
Figura 2.10 Olfatômetro em Y acoplado à arena.



Fonte: AUTOR, 2021.

Para os extratos de pinha, os compostos EAG ativos foram: mirceno, β -ocimeno e linalol (**Figura 2.11**). Para cada teste, foi utilizada a dosagem de 10 μ L de cada tratamento. Foram testados os compostos bioativos individuais e soluções, em duas concentrações (1 μ L/mL e 10 μ L/mL), das seguintes misturas: mirceno/ β -ocimeno/linalol, mirceno/ β -ocimeno, mirceno/linalol e β -ocimeno/linalol (**Tabela 1**).

Figura 2.11 Estrutura química dos compostos utilizados nos bioensaios.



O eppendorf contendo a solução microencapsulada foi colocado em um dos braços do sistema Y, no outro braço do sistema foi colocado o controle (extrato de pinha).

Foi utilizado um macho (virgem) por bioensaio. O extrato foi considerado preferencial, quando este atraísse os insetos ou provocasse os comportamentos de antenação, voo curto e/ou voo longo orientado em direção a fonte de odor. Foram realizadas dez repetições para cada tratamento (formulações dos compostos sintéticos individuais e respectivas misturas). O tempo de observação para cada bioensaio foi de quinze minutos e as posições dos braços do olfatômetro foram invertidas entre os tratamentos para evitar qualquer efeito tendencioso de habituação.

Tabela 2.1 Formulações testadas (tratamentos) formuladas em biopolímero.

Tratamentos (Concentrações de 1 e 10 μL/mL)
Mirceno
β -Ocimeno
Linalol
Mistura 1: (Mirceno/ β -Ocimeno/Linalol)
Mistura 2: Mirceno/ β -Ocimeno
Mistura 3: Mirceno/Linalol
Mistura 4: β -Ocimeno/Linalol

2.2.8. Análises estatísticas

Os comportamentos observados foram inseridos em tabelas de contingência, para ambas concentrações utilizadas. Foi empregado o Teste do Qui-quadrado, considerando a significância para $p < 0,05$, para associação dos comportamentos observados frente aos tratamentos testados.

Para a avaliação da atratividade, os dados obtidos foram analisados primeiramente com a finalidade de verificar os pressupostos paramétricos de normalidade e homogeneidade das

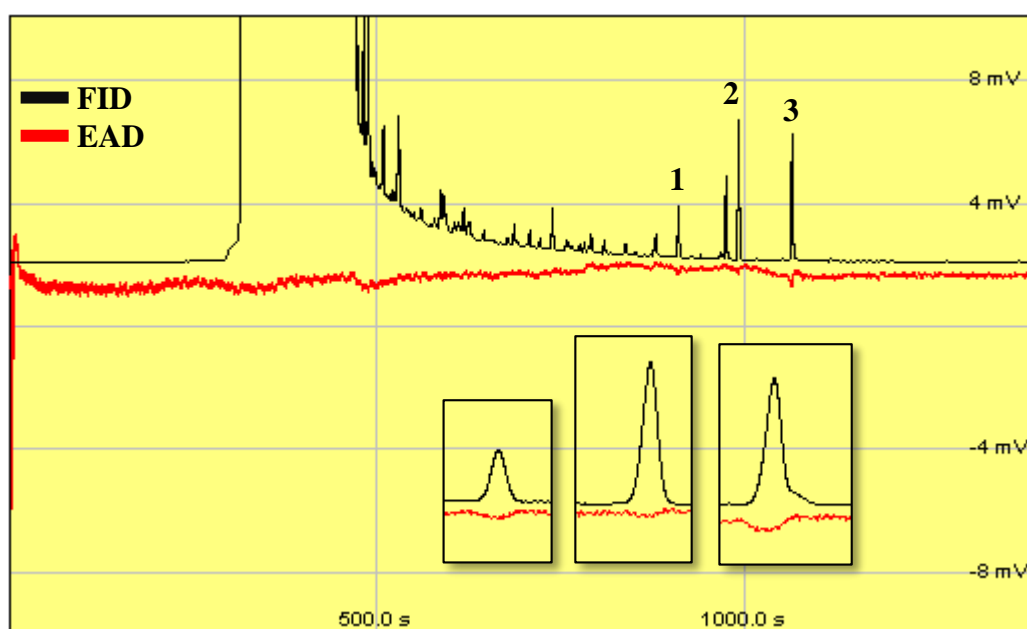
variâncias dos tratamentos. Uma vez que os parâmetros de normalidade não foram atendidos, o Teste Qui-quadrado ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) foi aplicado a fim de verificar quais tratamentos influenciaram no comportamento de atratividade de machos virgens de *Cerconota anonella*.

2.3. RESULTADOS

2.3.1 Identificação de compostos eletrofisiologicamente ativos para machos virgens de *C. anonella*

A análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Eletroantenografia (CG-EAG), com o extrato de pinha, revelou três compostos eletrofisiologicamente para os machos coespecíficos (**Figura 2.12**). Os compostos responsáveis pela despolarização das antenas foram três monoterpenos: mirceno, β -ocimeno e linalol.

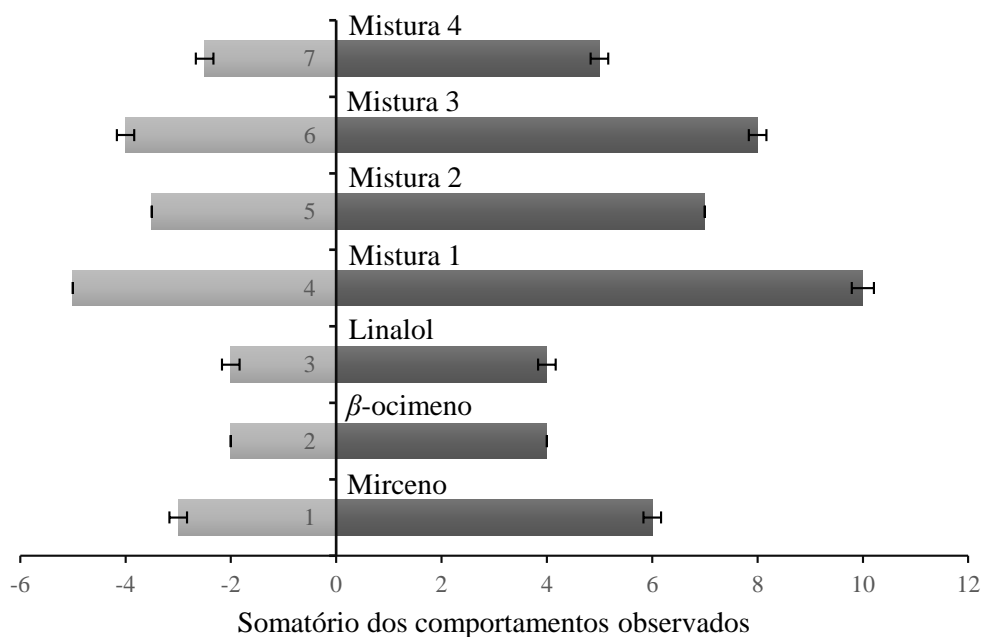
Figura 2.12 Identificação dos compostos EAG-ativos no extrato de pinha. FID: Detector de Ionização de chamas; EAG: Eletroantenografia; (1) Mirceno; (2) β -Ocimeno; (3) Linalol.



2.3.2 Associação entre os comportamentos e os tratamentos utilizados

As tabelas de contingência geradas consideram os comportamentos como categorias comportamentais e faz uma associação destes comportamentos com os tratamentos testados. De acordo com os resultados, para a concentração de $1\mu\text{L}/\text{mL}$, houve significância entre a associação das variáveis comportamentais e os tratamentos, com $p = 0,008874$, pelo Teste Qui-quadrado ($p < 0,05$) (**Figura 2.13**).

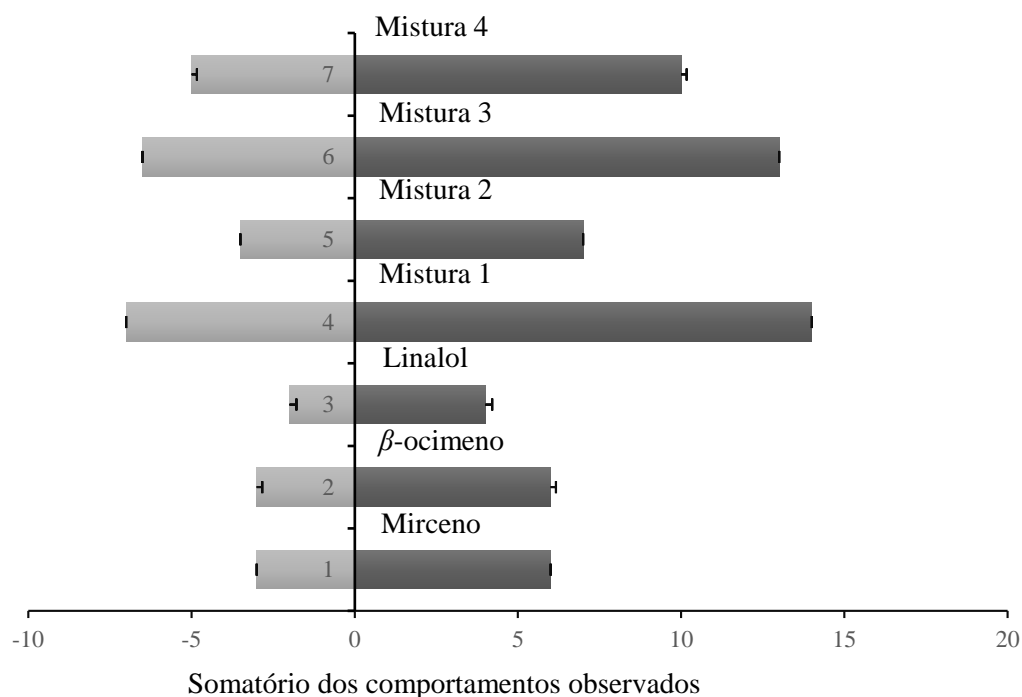
Figura 2.13 Associação entre comportamentos observados e os tratamentos testados (Concentração de 1 μ L/mL).



Nota: Mistura 1 (Mirceno, β -Ocimeno, Linalol), Mistura 2 (Mirceno, β -Ocimeno), Mistura 3 (Mirceno, Linalol), Mistura 4 (β -Ocimeno, Linalol). Significativo para a associação das variáveis comportamentais e os tratamentos com $p=0,008874$ pelo Teste Qui-quadrado ($p<0,05$).

De acordo com os resultados obtidos para a concentração de 10 μ L/mL (**Figura 2.14**), constatou-se que não houve significância na associação entre as variáveis comportamentais observadas pelo teste Qui-quadrado com $p<0,05$.

Figura 2.14 Associação entre comportamentos observados e os tratamentos testados (Concentração de 10 μ L/mL).

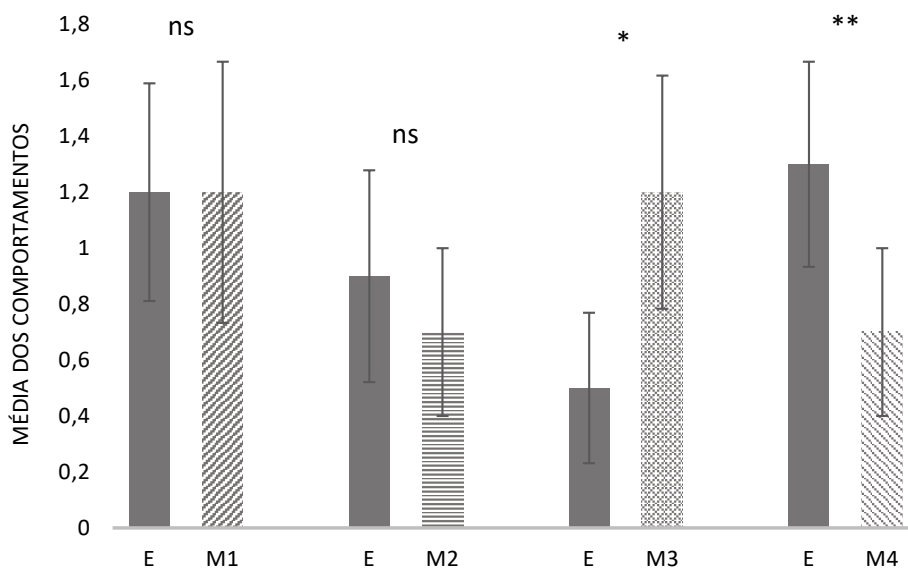


Nota: Mistura 1 (Mirceno, β -Ocimeno, Linalol), Mistura 2 (Mirceno, β -Ocimeno), Mistura 3 (Mirceno, Linalol), Mistura 4 (β -Ocimeno, Linalol). Não significativo para a associação das variáveis comportamentais com $p=0,999860$ pelo Teste Qui-quadrado ($p<0,05$).

2.3.3 Atratividade de machos virgens de *C. anonella* para as misturas dos compostos EAG-ativos.

Os ensaios comportamentais permitiram avaliar a preferência pela fonte de odor dos machos virgens de *C. anonella*. Os tratamentos foram testados frente ao extrato do fruto de pinha. Para os tratamentos na concentração de 1 μ L/mL, houve diferença significativa nas respostas das misturas M₃ e M₄ quando comparadas ao extrato do fruto pelo Teste Qui-quadrado, com $p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente. (**Figura 2.15**).

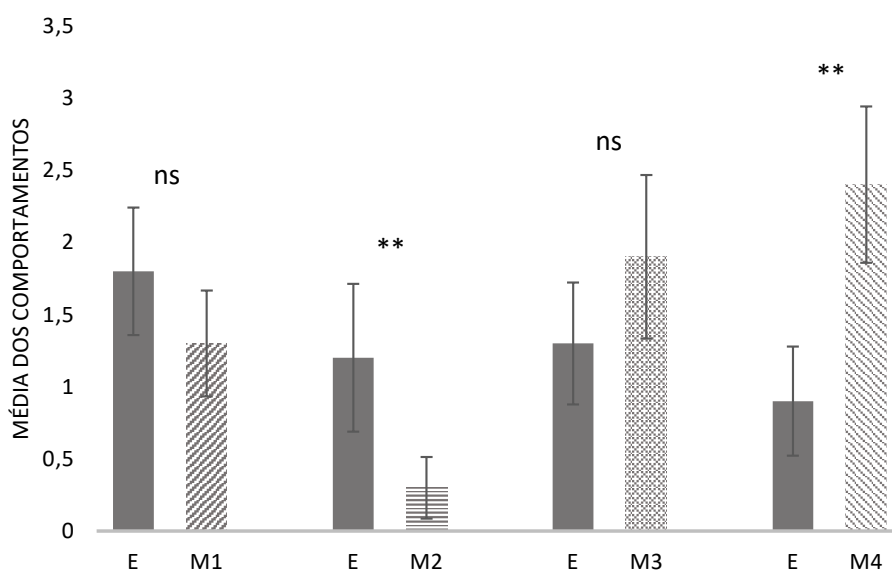
Figura 2.15 Média dos comportamentos exibidos por machos virgens de *C. anonella* para as misturas (Concentração: 1 μ L/mL) frente ao extrato de pinha.



Nota: Média dos comportamentos exibidos por machos virgens de *C. anonella* para misturas sintéticas de compostos voláteis bioativos. **E** (Extrato de aerção de frutos de pinha); **M₁** (Mirceno, β -Ocimeno, Linalol), **M₂** (Mirceno, β -Ocimeno), **M₃** (Mirceno, Linalol), **M₄** (β -Ocimeno, Linalol). * indica que as respostas médias são significativamente diferentes pelo Teste Qui-quadrado ($p < 0,05$), ** indica que as respostas médias são significativamente diferentes pelo Teste Qui-quadrado ($p < 0,01$) e ns indica que as respostas não são significativamente diferentes.

Diante de formulações contendo os diferentes tratamentos testadas na concentração de 10 μ L/mL, houve diferença significativa nas respostas das misturas M₂ e M₄ quando comparadas ao extrato do fruto pelo Teste Qui-quadrado, com $p < 0,01$ (**Figura 2.16**).

Figura 2.16 Média dos comportamentos exibidos por machos virgens de *C. anonella* para as misturas (Concentração: 10 μ L/mL) frente ao extrato de pinha.



Nota: Mistura 1 (Mirceno, β -Ocimeno, Linalol), Mistura 2 (Mirceno, β -Ocimeno), Mistura 3 (Mirceno, Linalol), Mistura 4 (β -Ocimeno, Linalol). ** indica que as respostas médias são significativamente diferentes pelo Teste Qui-quadrado ($p < 0,01$) e **ns** indica que as respostas não são significativamente diferentes.

2.4 DISCUSSÃO

As folhas, flores e frutos de plantas hospedeiras podem liberar centenas de compostos, mas estudos revelam que apenas uma pequena quantidade dos componentes presentes em uma mistura pode ser detectada pelas antenas do inseto e uma parte ainda menor parece estar envolvida na promoção de mudanças comportamentais em insetos fitófagos (ROJAS 1999, ZHANG et al., 1999, FRASER et al., 2003).

Na família Annonaceae, alguns constituintes voláteis já foram identificados. Segundo Ekundayo (1989), entre os 17 gêneros revisados, mais de duzentos compostos voláteis foram identificados em óleos essenciais de diversas espécies de anonáceas. Estes compostos são basicamente mono e sesquiterpenos, os mais comumente encontrados são: α -pineno, β -pineno, mirceno, β -ocimeno, limoneno, linalol e 1,8-cineol.

Em lepidópteros, a percepção de odores liberados por plantas hospedeiras é crucial para a localização do hospedeiro adequado, uma vez que as fêmeas utilizam essas pistas olfativas para escolher o sítio adequado para oviposição, garantindo o desenvolvimento das lagartas recém-eclodidas, de modo que a saúde do fruto, a idade e o estágio de maturação do hospedeiro devem ser suficientes para que as mesmas possam desenvolver-se completamente (BLACKMER et al., 2001).

Compostos voláteis de plantas já foram identificados como mediadores na atração de machos de algumas espécies de mariposas para plantas hospedeiras, tais como: *Cydia pomonella* (CORACINI et al., 2003), *Lobesia botrana* (ARX et al, 2011), *Hyphantria cunea* (TANG et al, 2012), entre outras. Em sua grande maioria, os compostos identificados são terpenóides, a saber: β -ocimeno, β -cariofileno, β -farneseno, α -farneseno, (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, dentre outros (CORACINI et al., 2003; ARX et al, 2011; TANG et al, 2012).

Os machos da *Lobesia botrana* percebem e respondem aos voláteis da planta hospedeira em níveis biologicamente relevantes, indicando que os voláteis da planta hospedeira *servem* como sinais olfativos que auxiliam os machos desta espécie na busca por lugares onde existe maior probabilidade de encontrar as fêmeas coespecíficas. Dos doze compostos EAD-ativos, quatro eliciaram mudança comportamental em machos de *L. botrana*, conhecida como traça da videira. Posteriormente, a resposta comportamental dos machos da traça da videira a quatro desses compostos apresentados individualmente e em misturas (1-hexanol, 1-octen-3-ol, acetato de (*Z*)-3-hexenila e (*E*)- β -cariofileno) foi registrada em túnel de vento (ARX et al, 2011).

Para as espécies do gênero *Cerconota*, anteriormente ao presente estudo, nenhum composto volátil de planta e/ou fruto hospedeiro foi identificado como atraente para os machos desta espécie.

No presente estudo, pelo uso das técnicas de CG-EAD e CG-MS foi possível identificar três compostos: mirceno, β -ocimeno e linalol, presentes no extrato de frutos maduros de pinha, que desencadeiam despolarização nas antenas de machos virgens de *C. anonella*. Com o objetivo de verificar, dentre os compostos de pinha identificados como EAD-ativos para machos virgens de *C. anonella*, quais compostos eliciam atração e, se todos eles contribuem efetivamente para a atração de machos virgens de *C. anonella*, foram conduzidos bioensaios comportamentais em laboratório, demonstrando-se que, duas misturas testadas contribuem igualmente para a atração de machos.

Quando os machos desta espécie foram expostos a duas composições idênticas com concentrações diferentes, as diferenças na concentração de voláteis da planta podem ter sido interpretadas como uma função da distância até a planta. No entanto, os resultados não fornecem indicação de que uma mariposa optaria por uma mistura de planta hospedeira em uma concentração mais alta, na verdade, a localização do hospedeiro dependerá predominantemente da composição da mistura, e não da concentração (RIFFELL et al, 2008; SPÄTHER, et al, 2013). Com bases nessas informações e, tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se inferir que, como as duas concentrações das misturas dos componentes voláteis de frutos de pinha desencadearam resposta atrativa em machos de *C. anonella*, as formulações em menor concentração podem ser usadas em testes futuros, sem perda da atratividade.

A comparação entre a associação dos comportamentos observados dos compostos bioativos quando testados individualmente e em misturas, apresentou maior resposta comportamental para as misturas dos compostos EAD-ativos. Esse fato corrobora com Bruce & Pickett, (2011), visto que eles afirmam que a atividade comportamental induzida por misturas de voláteis é mais forte do que aquela induzida por compostos individuais. O processamento olfativo de misturas voláteis geram respostas comportamentais que são diferentes das respostas eliciadas por compostos individuais. Existe, portanto, um nível de percepção da qualidade do odor que depende de combinações de voláteis para formar a percepção completa detectada pelo inseto.

Embora as plantas hospedeiras estejam frequentemente entre uma série de outras plantas, os insetos conseguem identificar seus hospedeiros de maneira específica, atendendo suas necessidades nutricionais e localizando sítios adequados para a oviposição. O reconhecimento da planta hospedeira depende das proporções de voláteis da planta e não apenas

da detecção da presença ou ausência de compostos específicos. Os neurônios receptores de odores (ORN's) presentes nas antenas dos insetos, permitem o reconhecimento de combinações específicas de voláteis, de maneira tal que, as misturas de constituintes voláteis exercem um papel primordial na identificação dos odores por parte dos insetos (BRUCE et al., 2005; BEYAERT et al., 2009).

Segundo Bruce & Pickett (2011), uma vez estabelecido que as misturas de voláteis desempenham um papel importante na codificação de odores do hospedeiro por insetos, é importante considerar a composição dessas misturas de odores e as propriedades necessárias para que funcionem como pistas de reconhecimento do hospedeiro. Frequentemente, a omissão de certos componentes em uma mistura de voláteis resulta na redução substancial da atividade atrativa, enquanto outros componentes desempenham um papel menor e podem ser omitidos sem perda significativa no nível de atração, o chamado efeito de redundância.

A atividade comportamental de machos de *C. anonella* foi avaliada a fim de verificar qual formulação é capaz de desencadear atratividade e se, de acordo com o efeito de redundância, misturas contendo apenas alguns dos componentes bioativos são igualmente eficazes na atração de machos coespecíficos.

Deste modo, os resultados demonstraram que a mistura ternária M₁, nas duas concentrações testadas, é tão atrativa quanto o extrato de frutos maduros de pinha, sem apresentar diferença estatística esses tratamentos. No entanto, as misturas binárias, M₃, na concentração de 1µL/mL, e M₄, na concentração de 10µL/mL, diferiram estatisticamente do tratamento controle, demonstrando serem mais atrativas que o extrato dos frutos maduros de pinha. Assim, pode-se inferir que os componentes eletrofisiologicamente ativos são parte da mistura usada por machos para localizar o hospedeiro. Todavia, a omissão do β-ocimeno, componente majoritário da mistura cairomonal do extrato de pinha, não reduziu a atratividade dos machos de *C. anonella*, corroborando com o efeito de redundância descrito por Bruce & Pickett (2011). Ainda foram observadas baixas respostas atrativas às misturas binárias M₂, na concentração de 10µL/mL, e M₄, na concentração de 1µL/mL, diferindo estatisticamente do extrato cairomonal.

Tasin e colaboradores (2007) verificaram a atratividade da traça da videira, *Lobesia botrana*, a uma mistura de 10 componentes voláteis que provocaram resposta antenal em fêmeas desta espécie. O efeito de redundância foi observado, uma vez que o comportamento atrativo para uma mistura de apenas três componentes, β-cariofileno, (E)-β-farneseno e (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, não diferiu significativamente quando comparado à atração da mistura de 10

componentes. Foi observado ainda que a omissão de algum desses três componentes, diminuiu drasticamente a resposta atrativa das fêmeas.

Bäckman et al. (2001) e Bengtsson et al. (2001) relataram a resposta antenal da mariposa *Cydia pomonella* aos voláteis de frutos de maçã. Coracini e colaboradores (2004) testaram, em campo e em túnel de vento, os compostos que elicitaram a resposta antenal em fêmeas de *C. pomonella*. Em campo, o composto (*E*)- β -farneseno capturou machos de *C. pomonella*. Entretanto, a adição de outros voláteis da maçã, incluindo (*E, E*)- α -farneseno, linalol ou (*E, E*)-farnesol ao (*E*)- β -farneseno, não aumentou significativamente a captura de machos nas armadilhas. Já em túnel de vento os machos foram atraídos para o (*E, E*)-farnesol e não para o (*E*)- β -farneseno, todavia, a adição de (*E, E*)- α -farneseno ao (*E*)- β -farneseno promoveu um efeito sinérgico na atração dos machos. Além disso, foi constatado que a sequência comportamental observada era equivalente ao comportamento desencadeado pelo feromônio sexual.

Para a mariposa *Hyphantria cunea*, praga da amoreira, dentre os onze compostos EAG-ativos, as antenas de machos respondem ao composto β -ocimeno e este composto, quando associado ao feromônio sexual, aumenta a atratividade de machos da espécie (TANG et al, 2012).

Além da comprovação da atratividade de machos para os voláteis dos frutos hospedeiros, a literatura reporta diversos estudos onde a atratividade é aumentada quando há uma combinação dos voláteis ao feromônio sexual (TANG et al, 2012; BENGTSSON et al, 2001; DENG et al, 2004).

Pelo exposto, é válido ressaltar a importância do estudo da influência dos voláteis dos frutos de pinha em machos virgens de *C. anonella*, a fim de verificar a possível sinergia dos voláteis dos frutos dos hospedeiros ao feromônio sexual na atração de machos de *C. anonella*.

2.5 CONCLUSÕES

A mistura de compostos voláteis liberada por frutos de pinha elicia comportamento de atração em machos virgens de *C. anonella*. Dentre os compostos presentes nesta mistura, os monoterpênicos mirceno, β -ocimeno e linalol eliciam respostas eletrofisiológicas em machos virgens desta espécie. O presente estudo demonstrou que as misturas M₃ (mirceno/linalol) e M₄ (β -ocimeno/linalol), nas concentrações de 1 μ L/mL e 10 μ L/mL, respectivamente, desencadeiam maior resposta atrativa em machos virgens, quando comparadas ao extrato cairomonal de frutos maduros de pinha, evidenciando que, nem todos os componentes da mistura cairomonal são essenciais para a atividade atrativa de machos coespecíficos.

Por fim, as formulações atraentes para machos virgens de *C. anonella* aqui descritas são inéditas e constituem novas ferramentas que podem ser usadas no manejo deste inseto-praga para diminuir o número de acasalamentos, pela interferência ou impedimento da transmissão de sinais entre os parceiros sexuais.

REFERÊNCIAS

- ARX, W. von; et al. Host plant volatiles induce oriented flight behaviour in male European grapevine moths, *Lobesia botrana*. **Journal of Insect Physiology** 57 (2011) 1323–1331.
- AGROFIT. **Agrofit: Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 02 dez. 2020.
- BÄCKMAN, A. C. et al. Volatiles from apple eliciting antennal responses in female codling moth *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae): effect of plant injury and sampling technique. **Zeitschrift für Naturforschung** 56c: 262–268. 2001.
- BENGTSSON, M. et al. Plant odor analysis of apple: antennal response of codling moth females to apple volatiles during phenological development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 49: 3736–3741. 2011.
- BEYAERT, I.; STILLER, J.; HILKER, M. Eggs deposition on a plant contributes to plant defense against feeding herbivores. In: **ANNUAL MEETING OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CHEMICAL ECOLOGY**, 25, 2009, Neuchâtel, Suíça, Abstract Book. Neuchâtel: ISCE, p. 228, 2009.
- BLACKMER J. L.; EIRAS A. E.; SOUZA C. L. M. Oviposition preference of *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) and rates of parasitism by *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) on *Lycopersicon esculentum* in São José de Ubá-RJ. **Neotropical Entomology**, Brazil. v. 30, p.89-95. 2001.
- BRUCE, T. J. A. et al. Insect host location: a volatile situation. **Trends in Plant Science**. 10 (6), 2005.
- BRUCE, T. J. A.; PICKETT, J. A Perception of plant volatile blends by herbivorous insects – Finding the right mix. **Phytochemistry**. V 72, 1605-1611, 2011.
- CORACINI, M. et al. Attraction of codling moth males to apple volatiles. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 110: 1–10, 2004.
- DENG, J. et al. Enhancement of attraction to sex pheromones of *Spodoptera exigua* by volatile compounds produced by host plants. **Journal of Chemical Ecology**, Vol. 30, No. 10, 2004.
- EKUNDAYO, O. A Review of the volatiles of the Annonacea. **Journal of Essential Oil Research**, Volume 1, Issue 5. 1988.
- FEENY, P. et al. Effects of plant odor on oviposition by the black swallowtail butterfly, *Papilio polyxenes* (Lepidoptera: Papilionidae). **J. Insect Behav**, n. 2, p. 803-827. 1989.

- FRASER, A. M.; MECHABER, W. L.; HILDEBRAND, J. G. Electroantennographic and behavioral responses of the sphinx moth *Manduca sexta* to host plant headspace volatiles. **J Chem Ecol.** 29:1813–1833, 2003.
- LANDOLT, P. J.; PHILLIPS, T. W. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. **Annual Review of Entomology**, v. 42, n. 1 p. 371-391, 1997.
- MÜHLEN, C. V.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B. Caracterização de amostras petroquímicas e derivados utilizando Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (CGxCG). **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 765-775, 2006.
- RAMASWAMY, S. B. Host finding by moths: sensory modalities and behaviors. **J. Insect Physiol**, n 34, p. 235-49. 1988.
- REDDY, G. V.; GUERRERO, A. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. **Trends in plant science**, v. 9, n. 5, p. 253-261, 2004.
- RIFFELL, J.A.; ABRELL, Lt.; HILDEBRAND, J.G. Physical processes and real-time chemical measurement of the insect olfactory environment. **J Chem Ecol.** 34: 837-85, 2008.
- ROJAS J.C. Electrophysiological and behavioral responses of the cabbage moth to plant volatiles. **J Chem Ecol** 25:1867–1883, 1999.
- SILVA, R. C. C. da. **Influência dos constituintes voláteis de pinha (*Annona squamosa* L.) e graviola (*Annona muricata* L.), no comportamento da broca - do - fruto *Cerconota anonella*.** Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Alagoas. Maceió: 56 p. 2012.
- SOBRINHO, R. B. et al. **Identificação e monitoramento de pragas na produção integrada da gravioleira.** 1. ed. Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.
- SOBRINHO, R. B. et al. Pragas da gravioleira. In: BRAGA SOBRINHO, R.; CARDOSO, J.E.; FREIRE, F. das C.O. **Pragas de fruteiras tropicais de importância agroindustrial.** Brasília: EMBRAPA-SPI/Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, p.132-141. 1998.
- SPÄTHER, A. et al. Host plant odors represent immiscible information entities-blend composition and concentration matter in hawkmoths. **PLoS ONE** 8:e77135, 2013.
- TANG, R.; ZHANG, J. P.; ZHANG, Z. N. Electrophysiological and Behavioral Responses of Male Fall Webworm Moths (*Hyphantria cunea*) to Herbivory-Induced Mulberry (*Morus alba*) Leaf Volatiles. **PLoS ONE.** 7(11). 2012.
- TASIN, M. et al. Synergism and redundancy in a plant volatile blend attracting grapevine moth females. **Phytochemistry.** 68, 203–209, 2007.
- THOMAZINI, M. J. A comunicação química entre os insetos: obtenção e utilização de feromônios no manejo de pragas. In: GONCALVES, R. C.; OLIVEIRA, L. C. de (ed.). **Embrapa Acre: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia.** Rio Branco, AC: Embrapa Acre, cap. 17, p. 338-354. 2009.

VISSER, J.H. Host odor perception in phytophagous insects. **Annu. Rev. Entomol**, n. 13, p. 121-144, 1986.

ZHANG, A. J. et al. Identification of a new blend of apple volatiles attractive to the apple maggot, *Rhagoletis pomonella*. **J Chem Ecol**. 25:1221–1232, 1999.

CAPÍTULO 3

**EFEITO SINÉRGICO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DOS FRUTOS DE PINHA
COM O FEROMÔNIO SEXUAL NA ATRAÇÃO DE MACHOS DE *Cerconota
anonella* (Lepidoptera: Depressaridae)**

RESUMO

A broca-do-fruto, *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Depressariidae), destaca-se como uma das principais pragas das culturas de anonáceas no Brasil, especialmente pinha e graviola. *C. anonella* limita o cultivo devido aos danos relevantes provocados aos frutos, diminuindo o potencial de produção da lavoura e gerando prejuízos econômicos. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito sinérgico da combinação dos voláteis de frutos hospedeiros de pinha (*Anona squamosa*) com o feromônio sexual produzido por fêmeas coespecíficas. Para tanto, fêmeas virgens de *C. anonella* foram utilizadas para a extração das glândulas abdominais responsáveis pela produção do feromônio sexual. Posteriormente, foram preparados extratos hexânicos contendo a mistura feromonal. Os constituintes voláteis dos frutos de pinha que desencadeiam a resposta antenal em machos foram identificados anteriormente, a saber: mirceno, β -ocimeno e linalol. Misturas dos compostos EAD-ativos foram utilizadas em bioensaios laboratoriais, em combinação com o extrato feromonal, a fim de verificar se a mistura do feromônio sexual e os voláteis dos frutos potencializam a resposta atrativa de machos virgens de *C. anonella*. Os resultados obtidos demonstram que as misturas M₁ (mirceno/ β -ocimeno/linalol) e M₄ (β -ocimeno/linalol), na concentração de 1 μ L/mL, quando adicionadas ao feromônio sexual, aumentam a resposta atrativa de machos virgens de *C. anonella* atraídos para estes tratamentos, diferindo significativamente do tratamento controle (extrato feromonal sozinho). Assim, o presente estudo mostra-se promissor, uma vez que as formulações obtidas podem ser usadas no Manejo Integrado de Pragas (MIP) para fins de monitoramento ou captura da broca-do-fruto.

Palavras-chave: Sinergia; broca-do-fruto; feromônio sexual.

ABSTRACT

The fruit borer, *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Depressariidae), stands out as one of the main pests of anonaceae crops in Brazil, especially custard apple and soursop. *C. anonella* limits the cultivation due to relevant damages caused to the fruit, reducing the crop's production potential and generating economic losses. The present work aimed to evaluate the synergy between the volatiles of custard apple (*Anona squamosa*) host fruits and the sex pheromone. For that, virgin females of *C. anonella* were used for the extraction of the abdominal glands responsible for the production of the sex pheromone. Subsequently, hexane extracts containing the pheromone mixture were prepared. The volatile constituents of custard apple fruits that trigger the antennal response in males were previously identified, namely: myrcene, β -ocimene and linalool. Mixtures of EAD-active compounds were used in laboratory bioassays, in combination with pheromone extract, in order to verify if the mixture of sex pheromone and fruit volatiles enhance the attractive response of virgin males of *C. anonella*. The results obtained demonstrate that the mixtures M₁ (myrcene/ β -ocymene/linalool) and M₄ (β -ocymene/linalool), at a concentration of 1 μ L/mL, when added to the sex pheromone, increase the attractive response of virgin males of *C. anonella* attracted to these treatments, differing significantly from the control treatment (pheromonal extract alone). Thus, the present study shows promise, since the formulations obtained can be used in Integrated Pest Management (IPM) for monitoring or capturing the fruit borer.

Keywords: Synergy; fruit borer; sex pheromone.

3.1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de frutas tem apresentado um crescimento contínuo. No ano de 2017 o volume foi de 865,2 milhões de toneladas, um aumento de 10,1% em comparação ao ano de 2008. O Brasil ocupa a terceira posição no ranking da produção mundial de frutas, com uma produção de 41,1 milhões de toneladas no ano de 2018. Com a oferta de frutas tropicais e de clima temperado durante boa parte do ano, a presença brasileira no mercado externo é possível pela extensão territorial do país, posição geográfica e condições de clima e solo privilegiadas (ANDRADE, 2020).

Por produzirem frutos de grande interesse comercial, as anonáceas compõem um grupo de plantas que se têm destacado em algumas partes do mundo, incluindo o Brasil. Entre os mais destacados membros desta família, estão a pinha (*A. squamosa*), a graviola (*A. muricata*), acherimólia (*Annona cherimola*) e a atemoia ((híbrido *A. squamosa* x *A. cherimola*). No Brasil, apenas pinha e graviola são anonáceas popularmente conhecidas em todos os estados (LEMOS, 2014).

No Nordeste brasileiro, região onde este estudo foi desenvolvido, pinha e graviola apresentam 97% e 90%, respectivamente de toda a área cultivada no país. Entretanto, conforme destacado por Sacramento e colaboradores (2009), a broca-do-frutos, *Cerconota anonella*, é considerada uma das principais pragas primárias em algumas regiões produtoras de anonáceas no Brasil (IBGE, 2021).

C. anonella ataca os frutos em qualquer tamanho e idade, e, à medida que as lagartas se alimentam da polpa, abrem galerias no fruto tornando-os impróprios para o consumo *in natura* e também para a comercialização, por dificultar a extração da polpa (FREITAS, 2012).

Atualmente, para minimizar os danos causados por esta praga, são empregados, basicamente, aos controles químico e cultural, por meio de pulverizações de inseticidas ou o ensacamento de frutos jovens, respectivamente. Entretanto, outras medidas são recomendadas visando diminuir os prejuízos às culturas hospedeiras, como monitoramento do pomar, uso de inimigos naturais, coleta e enterro de frutos atacados pela praga, uso de armadilhas, aplicação de inseticidas naturais e poda de ramos atacados (BRITO, 2010; LUNA, 1998; FREITAS, 2012).

Métodos alternativos, novos e promissores para combater insetos-praga incluem a manipulação de seu comportamento com a aplicação de versões sintéticas de semioquímicos (substâncias naturais voláteis e não voláteis envolvidas na comunicação intra e/ou

interespecífica entre organismos). Os semioquímicos podem ser usados, por exemplo, como iscas para monitorar a presença de insetos (REISENMAN et al., 2016).

Estudos comprovam a importância da relação dos insetos herbívoros frente aos seus respectivos hospedeiros. Essa integração pode gerar mudanças fisiológicas e/ou estimular comportamentos nos insetos, tais como os de alimentação, acasalamento e reprodução, devido a possibilidade de interações entre os feromônios dos insetos e os aleloquímicos da planta hospedeira (LANDOLT & PHILLIPS, 1997).

As plantas hospedeiras desempenham um papel essencial na produção e utilização de feromônios sexuais por insetos fitófagos, através do sequestro de componentes químicos bioativos e precursores de feromônios sexuais da planta hospedeira, na forma jovem ou adulta do inseto (NISHIDA, 2002).

A interrupção do acasalamento, em que grandes quantidades de um feromônio sexual sintético são liberadas em uma cultura, tem sido usada para erradicar pragas de insetos que se tornaram resistentes a pesticidas (WYATT, 2003; WITZGALL et al., 2010).

Os compostos voláteis presentes nas plantas hospedeiras podem desencadear um efeito atrativo no comportamento de insetos quando liberados em combinação com o feromônio sexual. Este efeito pode resultar em sinergia, de modo que a resposta de atração desencadeada pela combinação do feromônio sexual com os compostos voláteis da planta é maior do que a resposta exibida quando esses componentes são testados separadamente, podendo ser empregada em estratégia que visa a interrupção do acasalamento (REDDY & GUERRERO, 2004).

Diante do exposto, objetivou-se investigar a existência de sinergia entre o feromônio sexual liberado por fêmeas virgens de *C. anonella* e misturas dos compostos voláteis bioativos liberados por frutos hospedeiros de pinha (*A. squamosa*), na atração de machos virgens coespecíficos.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção dos insetos

Os frutos com sinais de ataque de *C. anonella* em diferentes estágios de maturação (**Figura 3.1A**), foram coletados em pomares localizados no município de Coruripe-AL (10°09'54''S; 36°21'07''W). Após a coleta, foram levados para o laboratório de Ecologia Química na Universidade Federal de Alagoas (UFAL), onde foram armazenados em gaiolas de madeira (30 cm de largura x 30 cm de comprimento x 30 cm de altura) com as laterais cobertas por tela (**Figura 3.1B**).

As lagartas foram retiradas dos frutos e transferidas para placas de Petri (90 mm x 15 mm) e mantidas em dieta artificial até a pupação (Da Silva, 2006). As pupas foram sexadas e mantidas em recipientes de vidro (14,8 cm x 30 cm x 30 cm) em condições seminaturais (fotoperíodo invertido de 12h:12h, $24,1 \pm 1,2$ °C e umidade relativa de $65,0 \pm 1,9\%$) (**Figura 3.1C**). Após a emergência, fêmeas e machos virgens de *C. anonella*, foram colocados em câmaras de vidro (9 cm x 16 x 9 cm) e alimentados com uma solução de sacarose em água a 10%. As fêmeas virgens foram usadas para obtenção do extrato feromonal e os machos virgens foram utilizadas em posteriores bioensaios laboratoriais.

Figura 3.1 Manutenção dos insetos



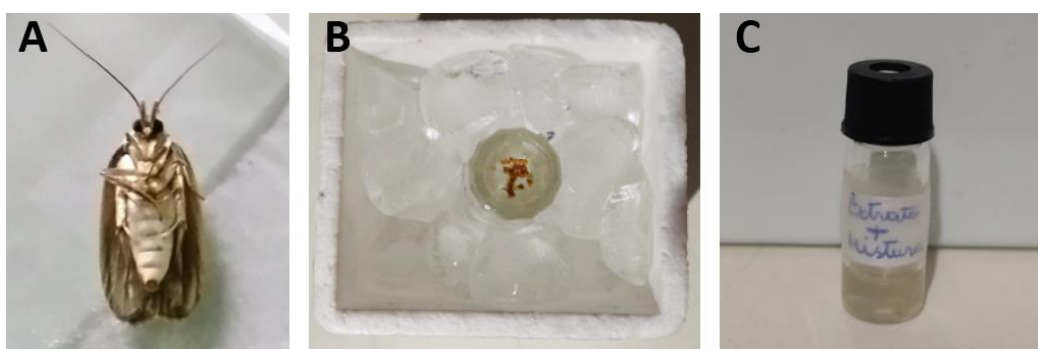
Fonte: AUTOR, 2021.

3.2.2 Obtenção de extratos de glândulas abdominais de *C. anonella*

Ao exibirem o comportamento de chamamento, dez fêmeas virgens, com idade de 2-3, foram retiradas das gaiolas de manutenção e levadas ao freezer (-5°C), durante 5 minutos, para fins de imobilização e de manutenção das condições fisiológicas da glândula produtora do

feromônio. Ao término desse período, as fêmeas foram retiradas do freezer (**Figura 3.2A**) e, com auxílio de um bisturi, o sétimo e oitavo segmentos abdominais de cada fêmea foram cortados e mantidos em uma cuba de vidro, onde permaneceram em contato com 100 μ L de hexano por cerca de 30 segundos. Durante todo o processo de preparação dos extratos, a cuba foi mantida imersa em gelo (**Figura 3.2B**), a fim de evitar a evaporação do solvente. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur o extrato obtido foi transferido para um tubo, tipo *vial*, anteriormente etiquetado e levado ao freezer para posterior utilização. (**Figura 3.2C**).

Figura 3.2 Obtenção dos extratos contendo o feromônio sexual. (A): Fêmea imobilizada; (B): Glândulas abdominais em cuba de vidro e (C): Extrato obtido.



Fonte: AUTOR, 2021.

3.2.3 Obtenção das formulações dos compostos voláteis sintéticos

Os padrões dos compostos sintéticos dos compostos eletrosifilogicamente ativos (mirceno, β -ocimeno e linalol) foram adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich, Brasil) com grau de pureza $\geq 98,5\%$. Soluções desses compostos em hexano foram preparadas em uma concentração total de 1 μ L/mL para uso nos bioensaios comportamentais. Esta concentração foi escolhida com base em bioensaios preliminares.

A partir das soluções estoques dos padrões sintéticos bioativos foram preparadas quatro misturas: **M₁** (mirceno/ β -ocimeno/linalol), **M₂** (mirceno/ β -ocimeno), **M₃** (mirceno/linalol) e **M₄** (β -ocimeno/linalol). Para o preparo das misturas foram utilizados volumes iguais de cada um dos padrões sintéticos.

Alíquotas de 10 μ L de cada tratamento foram formuladas em 0,01 g de microesferas de quitosana, com grau de desacetilação de 65%, através da adsorção por contato durante um período de 24h, para garantir a evaporação do solvente. As formulações preparadas foram colocadas em um frasco tipo eppendorf (10,7 mm de diâmetro x 39,5 mm de altura), e a tampa foi aberta antes do início de cada bioensaio. As formulações obtidas resultaram na dose 0,1 ng.

3.2.4 Bioensaios comportamentais

Para os bioensaios com machos virgens, foram confrontados entre si o extrato feromonal e a combinação do extrato com as quatro misturas de voláteis bioativos (extrato feromônol + voláteis), separadamente, na proporção 1:1, tendo o extrato como tratamento controle (Tabela1).

Tabela 3.1 Tratamentos testados formulados em biopolímero

Tratamentos
Extrato (E) <i>versus</i> Extrato + Mistura 1 (E+M ₁)
Extrato (E) <i>versus</i> Extrato + Mistura 2 (E+M ₂)
Extrato (E) <i>versus</i> Extrato + Mistura 3 (E+M ₃)
Extrato (E) <i>versus</i> Extrato + Mistura 4 (E+M ₄)

Para avaliar os comportamentos exibidos por machos virgens de *C. anonella*, os bioensaios foram realizados em arena de vidro (54 cm de comprimento x 25,8 cm de largura x 24,7 cm de altura), acoplada a um tubo de vidro bifurcado, conhecido como olfatômetro em “Y” (15,7 cm de comprimento x 4,4 cm de altura), e uma bomba de ar. O ar introduzido no olfatômetro foi purificado pela passagem em um filtro de carvão ativo (Figura 3.3).

Figura 3.3 Olfatômetro em Y, acoplado à arena.



Fonte: AUTOR, 2021.

Todos os bioensaios foram conduzidos em sala climatizada ($24,1 \pm 1,2$ °C e umidade relativa de $65,0 \pm 1,9\%$) durante a escotofase, entre 9h00 e 11h30. Pelo fato dos bioensaios

serem realizados no escuro, os mesmos foram conduzidos com auxílio de uma luz vermelha, para visualização do comportamento do inseto.

O eppendorf contendo o tratamento controle foi colocado em um dos braços do sistema Y, no outro braço do sistema foi colocado o eppendorf contendo a combinação feromônio+mistura de voláteis (Figura 3).

Foi utilizado um macho virgem por bioensaio. O extrato foi considerado preferencial, quando este atraísse os insetos ou provocasse os comportamentos de antenação, voo curto e/ou voo longo orientado em direção a fonte de odor. As posições dos braços do olfatômetro foram alteradas entre os tratamentos para evitar qualquer efeito tendencioso de habituação. Foram realizadas seis repetições para cada tratamento (soluções dos compostos sintéticos individuais e misturas). O tempo de observação para cada bioensaio foi de quinze minutos.

3.2.5. Análises estatísticas

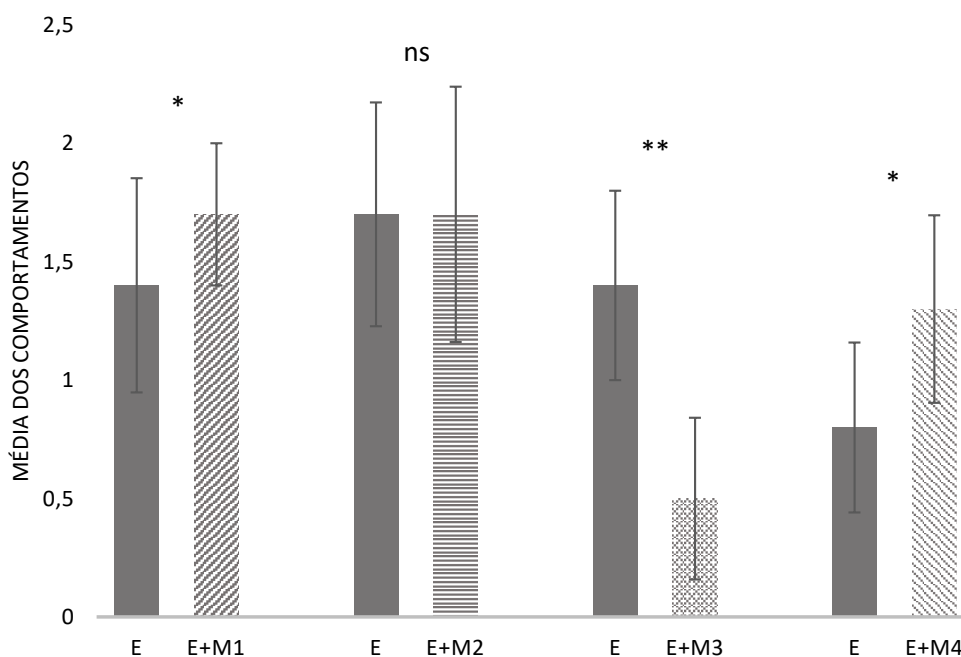
Para a avaliação da atratividade, os dados obtidos foram analisados primeiramente com a finalidade de verificar os pressupostos paramétricos de normalidade e homogeneidade das variâncias dos tratamentos. Uma vez que os parâmetros de normalidade não foram atendidos, o teste não-paramétrico Qui-quadrato ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) foi aplicado a fim de verificar quais tratamentos influenciaram no comportamento de atratividade de machos virgens de *C. anonella*.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Atratividade de machos virgens de *C. anonella* para as misturas dos compostos EAG-ativos em combinação com o feromônio sexual

Os ensaios comportamentais permitiram avaliar a preferência dos machos virgens de *C. anonella* pela fonte de odor. Os tratamentos foram testados frente ao extrato feromonal de fêmeas virgens coespecíficas. Foram observadas diferenças significativas nas respostas das misturas E+M₁, E+M₃ e E+M₄ quando comparadas ao extrato do fruto pelo Teste Qui-quadrado, com $p < 0,05$ e $p < 0,01$ (Figura 3.4).

Figura 3.4 Atratividade de machos virgens de *C. anonella* para as misturas dos compostos EAG-ativos em combinação com o feromônio sexual.



Nota: E (Extrato feromonal), E+M₁ (Extrato + Mistura 1: Mirceno, β -Ocimeno, Linalol), E+M₂ (Extrato + Mistura 2: Mirceno, β -Ocimeno), E+M₃ (Extrato + Mistura 3: Mirceno, Linalol), E+M₄ (Extrato + Mistura 4: β -Ocimeno, Linalol). * indica que as respostas médias são significativamente diferentes pelo Teste Qui-Quadrado ($p < 0,05$), ** indica que as respostas médias são significativamente diferentes pelo Teste Qui-Quadrado ($p < 0,01$) e ns indica que as respostas não são significativamente diferentes.

3.4 DISCUSSÃO

Ao detectar um parceiro, o sistema olfativo do inseto é confrontado não apenas com feromônios sexuais, mas também pela presença de odores de fundo, como voláteis de plantas, por exemplo. Os odores de fundo podem ser irrelevantes, "mascarar" o odor alvo, tornando-o irreconhecível, ou podem melhorar a resposta a um odor alvo (REISENMAN et al., 2016; SCHROEDER & HILKER, 2008)

Segundo Späthe et al (2013), iscas de odor com multicomponentes tendem a ser mais atraentes do que odorantes únicos, pois podem formar “objetos de odor” específicos e confiáveis, facilitando a localização do organismo alvo.

Um maior quantidade de insetos machos alcança ou se aproxima das fontes de feromônio quando plantas hospedeiras estão presentes, sendo assim, feromônios sexuais combinados com voláteis de plantas podem ser mais atraentes para insetos fitófagos, uma vez que tal mistura pode indicar a presença de um parceiro para acasalamento. (BINYAMEEN et al., 2013; REISENMAN et al., 2016).

Para os machos de *Grapholita molesta*, por exemplo, Varela e colaboradores (2011) observaram um efeito sinérgico entre os voláteis da planta hospedeira e o feromônio sexual liberado por fêmeas desta espécie. Eles utilizaram uma mistura de cinco compostos voláteis presentes no pessegueiro para determinar se os voláteis da planta hospedeira em combinação com à mistura sintética de feromônio sexual potencializavam a atração de machos de *G. molesta* em condições de laboratório. Eles concluíram que estes componentes voláteis quando associados ao feromônio das fêmeas desencadeiam respostas em machos de *G. molesta*, evidenciando o aumento de atratividade destes machos.

Deng e colaboradores (2004) mediram, em túnel de vento e em campo, a taxa de captura de machos de *Spodoptera exigua* quando expostos ao feromônio sexual com compostos voláteis produzidos por plantas hospedeiras. Benzaldeído, fenilacetaldéido, acetato de (Z)-3-hexenila e linalol foram adicionados, individualmente, ao feromônio e a taxa de captura de machos de *S. exigua* aumentou em 101,4%, 79,6%, 60,6% e 34,3%, respectivamente, em comparação ao feromônio sexual sozinho. Em testes de campo, armadilhas iscadas com o feromônio + (E)-2-hexenal, feromônio + fenilacetaldéido, feromônio + acetato de (Z)-3-hexenila e feromônio + (Z)-3-hexenol aumentaram as capturas de traças em 38,8%, 34,6%, 24,6% e 20,8%, respectivamente, em comparação com as armadilhas iscadas apenas com o feromônio. Sugerindo, assim, que os voláteis da planta hospedeira aumentam a resposta de orientação dos machos desta espécie para as fontes do feromônio sexual.

Em um estudo semelhante, Yang et al (2004) verificaram que os compostos voláteis sinergizam a atração de machos *Cydia pomonella* ao (*E,E*)-8,10-dodecadien-1-ol conhecido como codlemone. Voláteis que provocaram resposta antenal em machos de *C. pomonella*, a saber: linalol, (*E*)- β -farneseno e (*Z*)-3-hexen-1-ol, foram adicionadas, individualmente, ao (*E,E*)-8,10-dodecadien-1-ol e houve um aumento 60%, 58%, 56% e 37%, respectivamente, na atratividade de machos de *C. pomonella*.

No presente estudo, por meio de bioensaios laboratoriais, foi possível verificar a resposta atrativa de machos de *C. anonella* quando misturas dos constituintes voláteis de frutos maduros de pinha (mirceno, β -ocimeno, linalol) são adicionados ao extrato do feromônio sexual. Observou-se um aumento no número de respostas quando as misturas M₁ e M₄ foram adicionadas ao feromônio sexual, apresentando diferença estatística significativa quando testadas frente ao extrato feromonal sozinho. Assim, pode-se inferir que essas misturas, quando adicionadas ao extrato feromonal, potencializam a resposta atrativa de machos virgens de *C. anonella*, evidenciando a existência de sinergia entre o feromônio sexual e misturas de voláteis dos componentes bioativos presentes no fruto hospedeiro desse inseto-praga.

Tang e colaboradores (2012) demonstraram que a atração de machos de *Hyphantria cunea* foi amplificada ao serem adicionados compostos voláteis liberados por folhas de amoreira ao feromônio sexual. O β -ocimeno, por exemplo, composto volátil liberado por folhas danificadas por herbivoria, em sinergia com o feromônio sexual, aumentou a resposta atrativa de machos de *H. cunea*. De forma análoga, as misturas, ternária e binárias, dos voláteis de frutos de pinha adicionadas ao extrato feromonal de fêmeas amplificam a atividade comportamental de machos de *C. anonella*, ocasionando um aumento no número de respostas atrativas desses machos.

Em estudos realizados com a mariposa *Cydia pomonella*, foram avaliados os efeitos da adição de voláteis de plantas ao feromônio sexual nas respostas comportamentais de machos da traça-da-maça. Diferente de Yang e colaboradores, Schmera e Guerin adicionaram os voláteis de plantas à mistura feromonal, não apenas ao componente majoritário do feromônio. A adição de *R*(+)-limoneno, linalol, (*E*)- β -farneseno ou (*E, Z*)-2,4-decadienoato de etila aumentou significativamente a resposta de machos voando para a fonte de odor em túnel de vento. O resultado não difere das respostas de machos às fêmeas liberando o feromônio. Foi constatado ainda que o tempo de resposta, sob critérios comportamentais, foi encurtado. Assim sendo, encurtar o tempo de resposta e aumentar a atratividade para as formulações contendo o feromônio sexual pode ser a chave para aumentar a eficácia da interrupção do acasalamento desta espécie (SCHMERA & GUERIN, 2012).

A interação entre o feromônio e os voláteis de plantas hospedeiras pode apresentar uma importante pista química para os insetos encontrarem seus parceiros sexuais em sítios de cópula. Além disso, essa pista pode ser também ser um fator considerável no isolamento reprodutivo das espécies. Por fim, a pesquisa com semioquímicos apresenta vantagens importantes do ponto de vista ambiental, principalmente no que se refere a sua alta especificidade, seu caráter atóxico e eficácia em baixas concentrações (ALTAFINI, 2008; PIRES, 2013)

3.5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, foi demonstrado pela primeira vez que misturas dos constituintes bioativos de frutos de pinha, em combinação com o feromônio sexual de fêmeas virgens de *C. anonella* aumentam a resposta atrativa de machos virgens coespecíficos. Constatou-se que as misturas ternária e binária, M₁ e M₄, respectivamente, quando adicionadas ao extrato feromonal, potencializam o aumento no número de comportamentos exibidos por machos virgens, refletindo no aumento da atratividade desses machos.

Este foi o primeiro estudo relatado sobre a influência que os voláteis de frutos hospedeiros quando combinados com o feromônio sexual de *C. anonella*. Por serem atraentes, as misturas do extrato feromonal e os voláteis dos frutos têm grande potencial de uso no monitoramento e captura de *C. anonella*, visando diminuir a densidade populacional da praga.

REFERÊNCIAS

- ALTAFINI, D. L. **Percepção química de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) ao feromônio sexual e aos voláteis de plantas hospedeiras.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 77p, 2008.
- ANDRADE, P. F. S. **Fruticultura, Análise da Conjuntura.** Departamento de Economia Rural – DERAL. Governo do Estado do Paraná, Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. Paraná, 2020. Disponível em: < <https://www.agricultura.pr.gov.br/>>. Acesso em 15 nov. 2021.
- BINYAMEEN, M. et al. Modulation of reproductive behaviors by non-host volatiles in the polyphagous Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. **J. Chem. Ecol.** 39, 1273–1283, 2013.
- BRITO, E. A. **Flutuação populacional e avaliação de táticas de controle sobre a broca-do-fruto das anonáceas *Cerconota anonella* (Lepidoptera: oecophoridae).** Dissertação (Mestrado em produção vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.
- DENG, J. et al. Enhancement of Attraction to Sex Pheromones of *Spodoptera exigua* by Volatile Compounds Produced by Host Plants. *Journal of Chemical Ecology*. V. 30, 2037–2045, 2004.
- FREITAS, A. L. G. E. **Caracterização da produção e do mercado da graviola (*annona muricata* L.) no Estado da Bahia.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Bahia, 109p. 2012.
- IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 15 out. 2021.
- LANDOLT, P. J.; PHILLIPS, T. W. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. **Annual Review of Entomology**, v. 42, n. 1, 371-391, 1997.
- LEMOS, E. E. P. A produção de anonáceas no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 77-85, jan. São Paulo, 2014.
- LUNA, J.V.U. Fruticultura tropical: potencial brasileiro e desenvolvimento tecnológico. Salvador: **EBDA**, 14p. 1988.
- NISHIDA, R. Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 47, n. 1, 57-92, 2002.
- OCHIENG, S. A.; PARK, K. C.; BAKER, T. C. Host plant volatiles synergize responses of sex pheromone-specific olfactory receptors neurons in male *Helicoverpa zea*. **J. Comp. Physiol. A** 188, 325–333, 2002.
- PIRES, E. V. **Extração e identificação dos componentes do feromônio sexual de broca dos frutos da pinha e graviola, *Cerconota anonella* (Sepp., 1830)(Lepidoptera: Oecophoridae).** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Alagoas. 85p, 2013.

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

REISENMAN, C. E.; LEI, H.; GUERENSTEIN, P. G. Neuroethology of Olfactory-Guided Behavior and Its Potential Application in the Control of Harmful Insects **Frontiers Physiology**, 2016.

SACRAMENTO, C. K.; MOURA, J. I. L.; COELHO JUNIOR, E. Graviola. In: SANTOS-SEREJO, J. A. et al. (eds.). Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**. p. 95-13, 2009.

SCHMERA, D.; GUERIN, P. M. Plant volatile compounds shorten reaction time and enhance attraction of the codling moth (*Cydia pomonella*) to codlemone. **Pest Manag. Sci.** 68, 454–461, 2012.

SCHROEDER, R.; HILKER, M. The relevance of background odor in resource location by insects: a behavioral approach. **Bioscience**. 58, 308–316, 2008.

SPÄTHER, A. et al. Host plant odors represent immiscible information entities-blend composition and concentration matter in hawkmoths. **PLoS ONE** 8:e77135, 2013.

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

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

WITZGALL, P., KIRSCH, P., AND CORK, A. Sex pheromones and their impact on pest management. **J. Chem. Ecol.** 36, 80–100, 2010.

WYATT, T. D. Pheromones and Animal Behavior: Communication by Smell and Taste. **Cambridge: Cambridge University Press**, 2003.

YANG, Z.; BENGTSSON, M.; WITZGALL, P. Os voláteis da planta hospedeira sincronizam a resposta ao feromônio sexual na traça Codling, *Cydia pomonella*. **Journal of Chemical Ecology**. V 30, 619–629, 2004.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE INSETICIDA DA CASCA DO TRONCO DE *Genipa americana* SOBRE MACHOS E FÊMEAS DE *Cerconota anonella*

RESUMO

Cerconota anonella, conhecida como broca-do-fruto das anonáceas, é considerada uma das pragas mais sérias em plantios comerciais de pinha e graviola. Atualmente, não existem produtos comercialmente disponíveis para controlar os danos causados aos frutos por este inseto. Assim, com o objetivo de controlar esta praga, utilizam-se métodos como o ensacamento dos frutos verdes, metodologia que exige elevada mão de obra, e aplicação direta de inseticidas. Nesse último caso, a elevada toxicidade dos compostos utilizados sobre o ambiente e organismos não-alvos têm levado a um aumento na busca por produtos naturais isentos de toxicidade e efetivos no controle de insetos praga. Extratos de isolados de plantas têm apresentado atividade inseticida e por esse motivo têm sido alvo de estudos nos últimos anos. O Jenipapeiro, *Genipa americana* L., pertencente à família Rubiaceae é uma árvore originária da América Central e atualmente encontra-se distribuído nas regiões tropicais de diversos países da América, Ásia e África. Não havendo registros de que essa espécie de planta seja alvo de *Cerconota anonella*, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade inseticida do extrato da casca de *Genipa americana* contra a broca-do-fruto. Para tanto, foi preparado o extrato bruto em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 da casca do caule da planta e inserido nas dietas das lagartas e dos insetos adultos e, os mesmos, foram mantidos em contato com a dieta ao longo de 7 dias. Assim, analisou-se a sobrevivência dos insetos. Para as lagartas, o extrato de *G. americana* não apresentou taxa de mortalidade satisfatória. Entretanto, na avaliação dos adultos, constatou-se que o extrato, nas três concentrações testadas, resultou na mortalidade dos insetos, entretanto, o extrato a 25% gerou uma taxa de mortalidade de 70% em 3 dias de observação. Os resultados desta pesquisa são promissores para o emprego de métodos alternativos para o controle da broca-do-fruto.

Palavras-chave: *Cerconota anonella*; *Genipa americana* L.; bioinseticida.

ABSTRACT

Cerconota anonella, known as the fruit borer of annonaceae, is considered one of the most serious pests in commercial plantations of custard apple and soursop. Currently, there are no commercially available products to control the damage caused to fruits by this insect. Thus, in order to control this pest, methods such as bagging green fruits are used, a methodology that requires high labor and direct application of insecticides. In the latter case, the high toxicity of the compounds used on the environment and non-target organisms have led to an increase in the search for natural products free of toxicity and effective in controlling pest insects. Extracts from plant isolates have shown insecticidal activity and, for this reason, they have been the subject of studies in recent years. The Jenipapeiro, *Genipa americana* L., belonging to the Rubiaceae family is a tree originally from Central America and is currently found in tropical regions of several countries in America, Asia and Africa. There are no records that this plant species is a target of *Cerconota anonella*, the present study aims to evaluate the insecticidal activity of the *Genipa americana* bark extract against the fruit borer. For this, the crude extract was prepared in Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, from the plant stem bark and inserted into the diets of caterpillars and adult insects, and they were kept in contact with the diet over a period of time. 7 days. Thus, the survival of insects was analyzed. For caterpillars, the G. americana extract did not show a satisfactory mortality rate. However, in the evaluation of adults, it was found that the extract, in the three concentrations tested, resulted in insect mortality, however, the extract at 25% generated a mortality rate of 70% in 3 days of observation. The results of this research are promising for the use of alternative methods to control the fruit borer.

Keywords: *Cerconota anonella*; American *Genipa* L.; biopesticide.

4.1 INTRODUÇÃO

O Jenipapeiro (*Genipa americana L.*), pertencente à família Rubiaceae, é uma árvore originária na América Central e, atualmente, encontra-se amplamente distribuída nas regiões tropicais da América Central e do Sul. No Brasil, a cultura de jenipapo, é encontrada desde São Paulo até o Amazonas, principalmente na região litorânea, nativa de várzeas úmidas ou encharcadas (SOUZA, 2007; DE JESUS, 2020, LORENZI & MATOS, 2008).

A árvore do jenipapo pode atingir de 8 a 15 metros de altura, com copa bem ramificada e frondosa e tronco liso de 40 a 60 cm de diâmetro. Apresenta folhas simples, subcoriáceas, com comprimento de 15 a 25 cm. As flores, inicialmente brancas, são grandes. Os frutos são bagas globosas, possuem coloração amarelada, quando madura, e sementes achatadas na cor marrom-amareladas. A polpa apresenta coloração parda, sabor adocicado e odor característico (LORENZI & MATOS, 2008).

O jenipapeiro é uma árvore ornamental. O tronco fornece madeira de boa qualidade, amplamente utilizada na construção civil. O fruto geralmente é comercializado em feiras livres e supermercados, podendo ser consumido fresco ou utilizado na produção de doces, compotas, geleias, licor e vinho. O corante do fruto verde é empregado na pintura em rituais indígenas (CNIP, 2021).

Na composição do jenipapo podem ser encontrados importantes compostos bioativos como genipina, geniposídeo, β -sitosterol e diversos compostos fenólicos como, por exemplo, leucoantocianidinas, catequinas, flavanonas, antraquinonas, cumarinas e flavonóis, bem como triterpenóides e esteroides. O estudo fitoquímico da casca do caule revelou a presença de flavonas, flavonóis, xantonas, triterpenoides e saponinas. No extrato da folha foi constatada a presença de flavonóides e iridóides, associados à atividades biológicas (FARIA, 2019; OMENA et al. 2012; ALVES et al. 2017).

Os extratos de plantas têm sido amplamente investigados a fim de avaliar sua toxicidade em insetos-praga, visto que esses extratos possuem uma grande quantidade de metabólitos, primários e secundários, com efeitos diversos. Os metabólitos secundários de plantas, por exemplo, têm sido utilizados como pesticidas, podendo causar interferência tóxica nas funções bioquímicas e fisiológicas de insetos herbívoros (CHICUTA et al, 2021; BRATTSTEN, 1998.).

As substâncias com potencial inseticida podem ser obtidas a partir de moagem de partes de plantas ou ainda após a extração com solventes orgânicos ou aquosos. Uma vez disperso no ambiente, os extratos de plantas, podem dificultar a ação de insetos herbívoros, seja por inibir a alimentação, reduzir a oviposição, prejudicar o crescimento larval, ou por atrair polinizadores

ou inimigos naturais. Extratos vegetais também possuem moléculas com ampla diversidade química, tornando-se uma importante fonte para obtenção de produtos com alto valor biotecnológico (MARCIEL et al., 2010; MAZHAWIDZA et al., 2017; CAMAROTI et al., 2018; SANTOS, et al., 2018; CERDA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020; LIMA, 2019).

Devido aos efeitos negativos relacionados ao uso de produtos sintéticos, principalmente pesticidas halogenados e organofosforados, bem como a ascensão do uso de produtos naturais para auxiliar no manejo integrado de pragas (MIP) e às demonstrações de fitoquímicos como grande fonte de controle de pragas, diversos grupos de pesquisa traçaram o perfil de metabólitos secundários de uma variedade de espécies de plantas (DEHGHANI-SAMANI et al., 2015; FARIAS et al., 2018.).

Extratos de plantas com potencial inseticidas são cada vez mais explorados por ser de fácil obtenção e manuseio, e por possuírem o objetivo da otimização do controle de insetos de modo sustentável e economicamente eficaz, reduzindo o uso de agrotóxicos e buscando obter um equilíbrio entre interesse econômicos, ambientais e para saúde, propondo a associação harmoniosa de técnicas biológica, química, cultural e genética (BRAGA SOBRINHO et al., 2007; CHICUTA et al, 2021).

As plantas desenvolvem uma série de mecanismos de respostas que a protegem contra agentes fitopatógenos, insetos e estresses variados. Conhecer os mecanismos de defesa das plantas, bem como os mecanismos de resistência, é fundamental para auxiliar no desenvolvimento de uma agricultura sustentável, evitando perdas importantes de produtividade, seja através de estratégias de melhoramento das plantas ou através da aplicação de substâncias sintetizadas que induzam as defesas e/ou resistência das plantas (GIMENEZ et al, 2018; QAIM, 2020; AGRIOS, 2004).

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção do material biológico

4.2.1.1 Casca de *Genipa americana* L.

Cascas do caule de *Genipa americana* L. foram coletadas, de diferentes espécimes, no município de Coruripe-AL, e armazenadas em sacos plásticos transparentes. A coleta foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes (ICMBIO), processo 61847-2, e a identificação das exsiccatas de *G. americana* foi realizada previamente no herbário do Instituto de Meio Ambiente de Alagoas – IMA.

Após a coleta, o material vegetal foi levado para o Laboratório de Metabolômica e Proteômica na Universidade Federal de Alagoas (LAMP/UFAL), onde foi limpo e triturado em liquidificador para a obtenção de um pó fino. Após a secagem, o pó resultante foi acondicionado no freezer a -20°C.

4.2.1.2 Insetos

Frutos de *Annona muricata* (graviola), infestados, foram coletados em pomares, na Cooperativa Pindorama, localizada no município de Coruripe-AL, (10°09'54''S; 36°21'07''W). Após a coleta, foram levados para o laboratório de Ecologia Química na Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os frutos maduros e verdes, com sinais de ataque, foram armazenados em gaiolas de madeira (30 cm de largura x 30 cm de comprimento x 30 cm de altura) com as laterais cobertas por tela.

Os frutos brocados de *A. muricata*, a partir do sétimo dia após a coleta, foram utilizados para a remoção das lagartas de *C. anonella*. Com o auxílio de luvas e pinças, as lagartas foram individualmente retiradas e separadas em três estágios: estágio inicial (idade de 1-4 dias) estágio intermediário (idade de 5-9 dias), e estágio final (idade de 10 a 14 dias), denominadas, T1, T2 e T3, respectivamente.

Quanto aos insetos adultos, estes foram separados por sexo, logo após a emergência e, posteriormente, utilizados em bioensaios laboratoriais.

4.2.2 Extrato da casca de *G. americana*

Na proporção de 1:4 (m/v), conforme descrito por Costa e colaboradores (2018), 10 g do pó resultante da trituração das cascas do caule de *G. americana* foram pesados e adicionados

a 40 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, sob agitação suave por 12 h, circundado por gelo. Após a filtração da mistura, o precipitado foi descartado e o filtrado submetido à centrifugação por 15 min, $15000 \times g$ a 4°C . O precipitado resultante foi descartado e o sobrenadante denominado extrato bruto, sendo mantido sob refrigeração.

4.2.3 Bioensaios

Os bioensaios foram conduzidos no laboratório de Ecologia Química (UFAL), por meio de uma adaptação do método descrito por Silva (2012).

A dieta artificial das lagartas de *C. anonella*, nos três diferentes estágios, foi composta pelos seguintes ingredientes: gérmen de trigo (20,25 g), cloridrato de colina (0,675 g), sais de Wesson (6,75 g), ácido ascórbico (2,70 g), farelo de soja (26,25 g), açúcar (33,75 g), nipagin (1,125 g), ácido sórbico (0,50 g), ágar-ágar (11,00 g), solução vitamínica (7,5 mL), formol (0,75 mL), ambrasinto (0,30 mL), vita gold (0,25 mL) e água destilada (600 mL).

Nos bioensaios com as lagartas, em uma placa de Petri (5,5 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) foi colocada uma lagarta e uma porção da dieta artificial, com aproximadamente 5,5 g. Para o tratamento com o extrato, além dos ingredientes citados acima, no preparo da dieta, foram adicionados 50 mL de extrato em Tris-HCl 50 mM pH 8,0 na concentração de 25%. Como controle positivo, foi oferecido à lagarta apenas a dieta artificial, sem acréscimo de aditivos. E, como controle negativo, além desses ingredientes descritos anteriormente, foram adicionados 50 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8 ao preparo da dieta. Foram realizadas vinte repetições para cada tratamento, tendo a sobrevivência e peso larval observados durante 7 dias.

Para os bioensaios com os adultos, em uma câmara de vidro (9 cm de largura x 16 cm de comprimento x 9,5 cm de altura) Figura, foi colocado um inseto adulto e um frasco penicilina de vidro contendo a dieta. Como tratamento controle, a dieta era composta de uma solução de mel em água a 10%. Como controle negativo foi adicionada à dieta, na proporção de 1:1:8 (tris:mel:água), o Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Para o tratamento com o extrato, foi adicionado à dieta o extrato preparado em Tris-HCl 50 mM pH 8,0, também na proporção de 1:1:8 (extrato:mel:água). O extrato foi testado em três concentrações, a saber: 10%, 15% e 25%. Foram realizadas 30 repetições com 15 fêmeas e 15 machos.

Todos os testes foram realizados em sala climatizada ($24,1^\circ\text{C} \pm 1,2$ e $65\% \text{ UR} \pm 1,9$), com fotoperíodo invertido (12h:12h).

4.2.4 Análise estatística

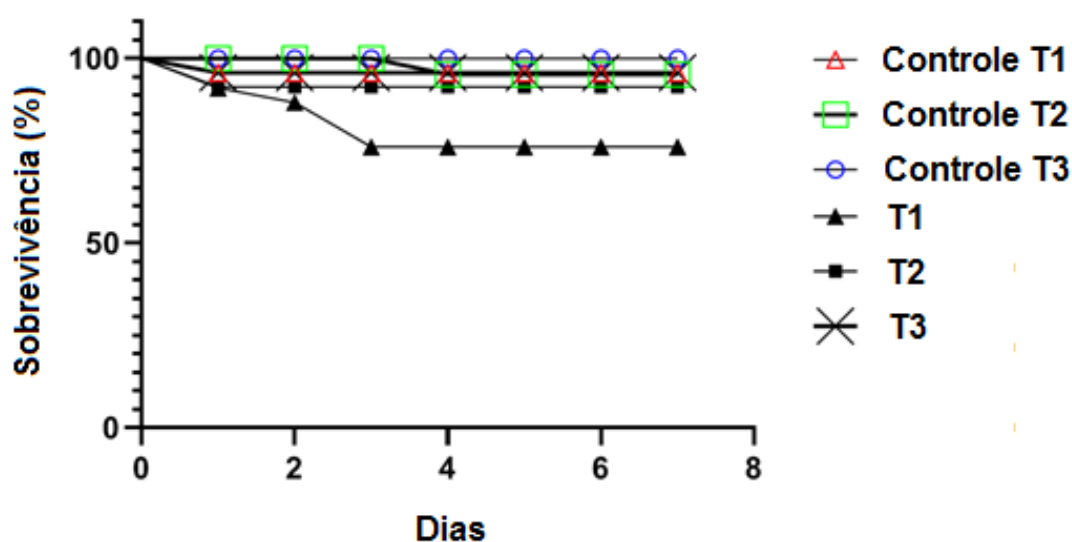
Os dados foram analisados pela ANOVA seguida de teste de *Tukey* para detecção de diferença significativa e comparação entre diferentes tratamentos. Os dados de mortalidade, obtidos durante os 7 dias de observação, foram utilizados para traçar a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Atividade do extrato da casca de *G. americana* sobre lagartas de *C. anonella*

As taxas de mortalidade em lagartas de *C. anonella*, nos estágios T1, T2 e T3, após ingestão da dieta artificial, contendo o extrato da casca de *Genipa americana*, foram de 25%, 10% e 5%, respectivamente (**Figura 4.1**). As lagartas que permaneceram vivas, deram continuidade ao ciclo de vida, passando para fase de pupa, e, em seguida, emergindo para a fase adulta sem defeito visível. Desse modo, o extrato não apresentou resultado satisfatório para o controle da praga na fase larval.

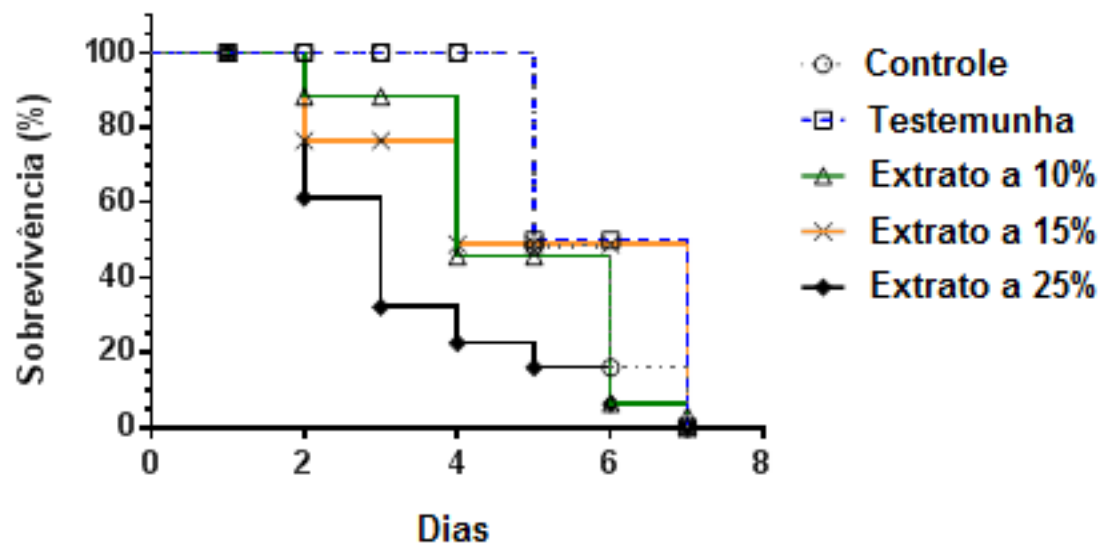
Figura 4.1 Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier das lagartas de *C. anonella* mantidas em dieta artificial com extrato da casca de *G. americana* a 25%.



4.3.2 Atividade do extrato da casca de *G. americana* sobre insetos adultos de *C. anonella*

O extrato da casca de *G. americana*, inserido na dieta artificial dos insetos adultos de *C. anonella*, nas doses a 10%, 15% e 25% provocou as taxas de mortalidade de 10%, 25% e 40%, respectivamente, no segundo dia de bioensaio. Já no terceiro dia de observação constatou-se uma taxa de mortalidade de 70% para o extrato com a dosagem mais alta (25%). Os tratamentos controle e testemunha só apresentaram mortalidade a partir do quinto dia de experimento (**Figura 4.2**).

Figura 4.4 Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de adultos de *C. anonella* mantidas em dieta artificial com diferentes doses do extrato da casca de *G. americana*.



4.4 DISCUSSÃO

Com o intuito de eliminar os insetos-pragas, os inseticidas químicos são amplamente empregados em diversas culturas. Entretanto, o uso excessivo dessas substâncias causam intoxicação do solo, intoxicações alimentares e seleção de insetos resistentes aos inseticidas químicos, tornado o combate a eles cada vez mais difícil (CELESTINO et al., 2016).

Nas últimas décadas têm aumentado à procura pelo desenvolvimento de tecnologias e produtos para o controle de insetos-praga que sejam eficientes, seguros, seletivos, biodegradáveis, viáveis economicamente e com aplicabilidade em programas de manejo integrado de pragas. Compostos oriundos de metabólitos secundários de plantas apresentam uma alternativa segura por possuírem substâncias reconhecidas com atividade biológica inseticida (VIEGAS JÚNIOR, 2003; CELESTINO et al., 2016).

O extrato da casca de *Genipa americana*, por exemplo, afetou a sobrevivência de insetos adultos de *Tribolium castaneum*. Por ser uma fonte de compostos inseticidas, o extrato diminuiu a taxa de eclosão das larvas de *T. castaneum* em até 96% e alcançou uma taxa de 73% de mortalidade em insetos adultos. (LIMA et al., 2020).

De Jesus e colaboradores (2020) relataram que o jenipapo é promissor no controle da praga do coco, *Aceria guerreronis* Keifer. As folhas de *G. americana* possuem iridóides, onde os principais são genipina e geniposídeo, com atividade acaricida. Os resultados demonstram que os extratos contendo genipina e geniposídeo mataram 50% e 62% de *A. guerreronis*, respectivamente, após 24 horas de exposição. Os bioensaios realizados ainda revelaram toxicidade dos extratos das folhas de *G. americana* para *A. guerreronis* por até 36 horas após a pulverização, bem como repelência do ácaro do coco após 1, 24 e 48 horas de exposição.

Em lepidópteros, o extrato metanólico de folhas de nim e o extrato de óleo de semente de nim apresentaram resultados satisfatórios quanto à toxicidade à lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*. As taxas de mortalidade larval, com as concentrações de 3% v/v e 5% v/v dos extratos metanólicos de folhas de nim, atingiram 80% e 90,5%, respectivamente, após 6 horas de bioensaio, e alcançaram 100% de mortalidade larval, em ambas as concentrações, após 12 horas de aplicação. A ingestão das concentrações de 3,0 v/v e 5,0% v/v do extrato de óleo de semente de nim resultou em 100% de mortalidade larval após 6 horas de observação (TULASHIE et al., 2020).

Contra a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*, dois extratos possuem ação inseticida: extrato metanólico de *Vernonanthura westiniana* e extrato de *Clerodendrum splendens*, em

diclorometano ou em hexano. O extrato metanólico de *V. westiniana*, provocou mortalidade superior a 80% na população de lagartas de *A. gemmatalis*. Enquanto o extrato de *C. splendens* causou mortalidade acima de 60% em lagartas, além de redução no ganho de peso de larvas e de pupas insetos (MARINHO-PRADO et al., 2018).

O efeito bioinseticida sobre lagartas de *C. anonella* foi testado com extratos aquosos de *Piper cf. aduncun*, do pedúnculo do botão floral do craveiro-da-índia, *Syzygium aromaticum*, e do óleo emulsionável a base de nim (Neemseto©). Em laboratório, após 12 horas de aplicação, os extratos de *Piper cf. aduncun* (10,0%), *S. aromaticum*, (5,0% e 10,0%), e do óleo emulsionável a base de nim (Neemseto©) (1,0%), resultaram em taxas de 3%, 10,71% e 17,86% de mortalidade de lagartas de *C. anonella*, respectivamente (BRITO, 2010).

No presente estudo, quanto à sobrevivência, os testes com lagartas de *C. anonella* não apresentaram resultados promissores. Segundo Marinho-Prado et al. (2018), após provar o alimento o inseto pode ser estimulado para seguir se alimentando ou para parar de se alimentar. Um deterrente alimentar é qualquer substância capaz de reduzir a alimentação do inseto, dessa forma, a ação deterrente pode ser consequência de uma ação direta dos metabólitos secundários sobre os receptores gustativos dos insetos (MARINHO-PRADO et al., 2018).

Belmonte (2015) avaliou o potencial inseticida de extratos da casca e cerne de *Myracrodruon urundeuva* contra o gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais*, entretanto, não foram constatadas mortalidade e atividade deterrente dos insetos quando os extratos foram adicionados na dieta. Contudo, os extratos interferiram nos parâmetros nutricionais dos insetos, em todos os tratamentos com os extratos houve redução da biomassa corporal.

A dose de 25% do extrato de *G. americana* apresentou uma taxa de mortalidade, em insetos adultos de *C. anonella*, de 70% no terceiro dia de bioensaio e alcançou a marca de 85% de mortalidade no quinto dia de observação, diferindo dos tratamentos controle e testemunha.

4.5. CONCLUSÕES

Quando testados em lagartas de *C. anonella*, em três estágios diferentes (T1, T2 e T3), os extratos da casca de *G. americana* não apresentaram resultado satisfatório quanto à mortalidade. Entretanto, quando testados em insetos adultos, os resultados demonstraram que o extrato, na maior concentração (25%), apresentou taxa de mortalidade de 70% em 3 dias de observação.

Em suma, com base nos resultados obtidos, o presente trabalho representa uma grande contribuição para a busca por métodos alternativos para o controle da broca-do-fruto, sendo este o primeiro relato sobre a ação de *G. americana* sobre insetos de *C. anonella*.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. Plant Pathology (5th ed.). USA: **Elsevier Academic Press**. 2004.
- ALVES, J.S.F. et al. Iridóides do extrato de folhas de *Genipa americana*. **Rev Bras de Farmacogn.** 27 (5): 641-644, 2017.
- BELMONTE, B. R. **Determinação do potencial inseticida de extratos e lectinas de casca e cerne de *Myracrodruon urundeuva* contra o gorgulho do milho (*Sitophilus zeamais*).** Dissertação de mestrado. Universidade de Pernambuco. 74p. 2015.
- BRAGA SOBRINHO, R. Produção integrada de Anonáceas no Brasil. **Rev. Bras. Frutic.** 36 (spe1), 2014.
- BRATTSTEN, L.B. Cytochrome P-450 involvement in the interactions between plant terpenes and insect herbivores. In: DUNKEL, F.V. & SEARS, L.J. Fumigant properties of physical preparatios from mountain big sagebrush, *Artemisia tridentata* Nutt. Ssp. vaseyana (Rydb.) beetle for stored grain insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 34, n. 4, p. 307-321, 1998.
- BRITO, E. A. **Flutuação populacional e avaliação de táticas de controle sobre a broca-do-fruto das anonáceas *Cerconota anonella* (Lepidoptera: oecophoridae).** Dissertação (Mestrado em produção vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.
- CAMAROTI, J. R. S. L. et al. *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). **Industrial Crops & Products**, V. 116. p. 81–89, 2018.
- CASTRO, M. J. P. et al. Potencial de extratos de frutos frescos e desidratados de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) no desenvolvimento da lagarta-do-cartucho do milho. **Magistra Cruz das almas**. v. 22, n. 2. Bahia, 2010.
- CELESTINO, C. O. et al. Ação inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Jacq.). **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, Vol 3, No. 2, 2016.
- CERDA, H., et al. Effects of aqueous extracts from Amazon plants on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and *Brevicoryne brassicae* (Homoptera: Aphididae) in laboratory, semifield, and field trials. **J. Insect Sci.** 9, p. 1- 9, 2019.
- CHICUTA, C. P. et al. **Extratos de plantas com potencial inseticida do Bioma Brasileiro: um referencial teórico.** In: Ciências agrárias [livro eletrônico]: o avanço da ciência no Brasil. Volume 1. Organizador: Júlio Onésio Ferreira Melo. Guarujá, São Paulo. 2021.
- CNIP. Centro Nordeste de Informações sobre Plantas. 2021. **Jenipapo – Aproveitamento de frutas**. 2021. Série 06: Frutas Nativas. Disponível em: <<http://www.cnip.org.br/PFNMs/jenipapo.pdf>>. Acesso em: 11 nov 2021.

COSTA, R. B. et al. Purification and characterization of a lectin with refolding ability from *Genipa americana* bark. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 517-523, 2018.

DEHGHANI-SAMANI, A. et al. Atividades acaricidas e repelentes de óleo essencial de *Eucalyptus globulus* contra *Dermanyssus gallinae* (Acari: Mesostigmata). **J Herbmed Pharmacol.** 4 (3): 81-84, 2015.

DE JESUS, A. S. et al. Bioactivity of iridoids of *Genipa americana* against the coconut mite *Aceria guerreronis* Keifer (Acari: Eriophyidae). **Revista de Protección Vegetal.** Vol. 35, No. 1, 2020.

FARIAS, A. P. et al. Bioactividad de aceites vegetales a *Orthezia praelonga* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Orthezidae) e selectividad a su predador *Ceraeochrysa caligata* (Neuroptera: Chrysopidae). **Rev. Protección Veg.** 33 (3): 1-9, 2018.

FARIA, Tenila dos Santos. **Avaliação do efeito do processo de secagem do extrato de jenipapo (Genipa americana L.)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 79p. 2019.

FARIAS, A. M. **Bioatividade do óleo essencial de Piper tuberculatum Jacq sobre a lagarta-do-cartucho-do-milho Spodoptera frugiperda (J. E. Smith. 1797) (Lepidoptera:Noctuidae)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2012.

GIMENEZ, E., SALINAS, M., & MANZANO-AGUGLIARO, F. Worldwide Research on Plant Defense against Biotic Stresses as Improvement for Sustainable Agriculture. **Sustainability**, 10 (391), 2018.

LIMA, I. M. S F. et al. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (StELL) has anti- -infective action and modulates the response of *Staphylococcus aureus* infected macrophages. **Scientific Reports.** V. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.

LIMA, J. K. A. et al. Biototoxicity of aqueous extract of *Genipa americana* L. bark on red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst). **Industrial Crops & Products**, v. 156, p. 1-6, 2020.

LIU, Z. L. et al. Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research.** 43 (3), 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** 2ª ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum. 2008.

MARINHO-PRADO, J. S. et al. **Bioatividade de extratos de plantas sobre lagartas de Anticarsia gemmatalis e Helicoverpa armigera.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2018.

MARCIEL, M. V. et al. Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. **Rev. bras. plantas med.** V.12, n.1, Botucatu, 2010.

MAZHAWIDZA, E., MVUMI, B. M. Field evaluation of aqueous indigenous plant extracts against the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. and the rape aphid, *Brevicoryne brassicae* L. in brassica production. **Ind. Crops Prod.** 110, p. 36–44, 2017.

NAPOLEÃO, T. H. et al. Deleterious effects of Myracrodruon urundeuva leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of stored products research**, 54, 26-33. 2013.

OLIVEIRA, A. P. S. et al. Evaluation of the insecticidal activity of *Moringa oleifera* seed extract and lectin (WSMoL) against *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**. 87. 101615. 2020.

OMENA, C.M.B. et al. Atividades antioxidante, anti-acetilcolinesterase e citotóxica de extratos etanólicos de casca, polpa e sementes de frutas brasileiras exóticas. **Food Res Int.** 49 (1): 334-344, 2012.

QAIM, M. Role of New Plant Breeding Technologies for Food Security and Sustainable Agricultural Development. **Applied Economic Perspectives and Policy**, 42(2), 129–150, 2020.

SANTOS, V. S. V.; CUNHA, J. R., SILVA, P. H. S. Atividade ovicida e repelente de pó de citronela sobre o caruncho do feijão-caupi. **Rev Verde Agroecol Desenv Sust.** 13(2):146- 149, 2018.

SILVA, R. A. **Análise metabolômica e atividade biológica de *Piper reticulatum* L.** Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.

SILVA, R. C. C. da. **Influência dos constituintes voláteis de pinha (*Annona squamosa* L.) e graviola (*Annona muricata* L.), no comportamento da broca - do - fruto *Cerconota anonella*.** Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Alagoas. Maceió: 56 p. 2012.

SOUZA, C. N. **Características físicas, físico-químicas e químicas de três tipos de Jenipapos (*Genipa americana* L.).** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Santa Cruz, 2007.

TULASHIE, S. K. et al. Potential of neem extracts as natural insecticide against fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)). **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 4, p. 1-7, 2021.

VIEGAS JÚNIOR, C. J. Terpenes with insecticidal activity: an alternative to chemical control of insects. **Química Nova**, Vol. 26, No. 3: 390-400, 2003.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA



22/05/2020 870200063478
12:09



29409161919090095

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

Número do Processo: BR 10 2020 010265 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Formulações sintéticas com atividade cairomonal, a partir de compostos voláteis de frutos de pinha (*Annona squamosa*), atraentes para machos de *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Depressariidae)

Resumo: A broca-do-fruto das anonáceas, *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Oecophoridae), pode ser encontrada em diversos países da América Latina. No Brasil, encontra-se bastante disseminada, ocorrendo em todas as regiões brasileiras, exceto na região sul, e atacando principalmente frutos de pinha e graviola. Os estudos com relação à comunicação química desta espécie são escassos, não havendo nenhum registro de produtos específicos no combate deste inseto praga. Assim, técnicas que visam capturá-lo, por meio de atrativos específicos baseados em compostos voláteis que desencadeiam mudanças comportamentais no receptor do organismo (semioquímicos), são objetos importantes das investigações científicas. Deste modo, o presente estudo objetivou identificar formulações atrativas para machos virgens de *C. anonella*, a partir de compostos voláteis liberados por frutos de pinha no estágio maduro de maturação. Os resultados obtidos demonstram que três compostos: mirceno, β -ocimeno e linalol eliciaram atividade antenal em machos desta espécie. Nos bioensaios comportamentais, quatro misturas, na dose de 1ng, destes componentes desencadearam atratividade em machos virgens de maneira análoga ao extrato de pinha no estágio maduro de maturação. Os resultados desta pesquisa demonstraram que as misturas testadas são promissoras para emprego como iscas olfativas na captura de machos em pomares de pinha infestados com esta espécie no território brasileiro.

Figura a publicar: 01

30/07/2020 870200094837
09:47

29409161921671180

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

Número do Processo: BR 10 2020 015516 4

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

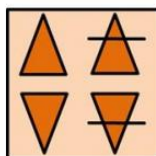
Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Olfatômetro com tubo bifurcado acoplado à ampla área de monitoramento retangular, para experimentos com insetos de pequeno porte

Resumo: O olfatômetro com tubo bifurcado acoplado a área de monitoramento retangular/arena é confeccionado para simular experimentos de atratividade, repelência e comportamento de insetos, especificamente para o lepidóptero *Cerconota anonella*. Esta invenção permite que o observador qualifique e quantifique a resposta do inseto diante de uma fonte de estímulo, estabelecendo assim padrões de comportamentos em insetos e confirmando a atratividade e/ou repelência dos estímulos que estão sendo testados. Pode ser utilizada com diversas finalidades, com foco principal para realização de experimentos científicos com insetos de pequeno porte. É de fácil manuseio, prático e viável economicamente.

Figura a publicar: 1



VI Simpósio Nordestino Virtual de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia

Química a Serviço da Sociedade



Effects of plant extract on the biochemistry profile of the *Annona* fruit borer *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Oecophoridae)

Keilane C. Franca (PG),^{1*} Cristiane C. dos S. Tavares (PG),¹ Camila P. de L. Chicuta (PG),¹ Josiel S. do Nascimento (PG),² Luciano A. M. Grillo (PQ),² Ruth R. do Nascimento (PQ),¹ Francis S. Gomes (PQ).¹

• keilanecef@gmail.com

¹Instituto de Química e Biotecnologia- UFAL

²Instituto de Ciências Farmacêuticas- UFAL



The Brazilian Chemistry Society (SBQ) and the IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry certify that

CRISTIANE CANUTO DOS SANTOS; CLAUDINETE SANTOS SILVA; NATHALY COSTA DE AQUINO; RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS; JÉSSICA LIMA SANTOS; LUCIE VANICKOVA; ADRIANA DE LIMA MENDONÇA; RUTH RUFINO DO NASCIMENTO

presented the ORAL PRESENTATION **OVIPOSITION ATTRACTANTS FOR CERCONOTA ANONELLA (LEPIDOPTERA: OECOPHORIDAE) FEMALES FROM SOURSOP** in the **46th World Chemistry Congress, 40^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química** and **IUPAC 49th General Assembly** held from July 7th to 14th, 2017 in São Paulo - Brazil.

São Paulo, July 14th, 2017.



Adriano D. Andricopulo

Adriano D. Andricopulo
Organizing Committee
Chairman

Aldo José Gorgatti Zarbin

Aldo José Gorgatti Zarbin
SBQ - Brazilian Chemical Society
Chairman