

**COMPORTAMENTO REPRODUTIVO, EXTRAÇÃO E
IDENTIFICAÇÃO DO FEROMÔNIO SEXUAL DA BROCA
PEQUENA DA CANA-DE-AÇÚCAR *Diatraea flavipennella*,
Box, 1931(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

Adriana de Lima Mendonça

MACEIÓ-AL

Março-2009

Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Química e Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia-PPGQB

**COMPORTAMENTO REPRODUTIVO, EXTRAÇÃO E
IDENTIFICAÇÃO DO FEROMÔNIO SEXUAL DA BROCA
PEQUENA DA CANA-DE-AÇÚCAR, *Diatraea*
flavipennella, Box, 1931 (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

Adriana de Lima Mendonça

Tese apresentada ao
Instituto de Química e
Biotecnologia da Universidade
Federal de Alagoas, para fins de
obtenção de título de Doutorado
em Química e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ruth Rufino do
Nascimento

Maceió, AL
Março de 2009

Esta tese contém material que está sob sigilo de Patente.

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

M539c

Mendonça, Adriana de Lima.

Comportamento reprodutivo, extração e identificação do feromônio sexual da broca pequena da cana-deaçúcar, *Diatrea flavipennella*, Box, 1931 (Lepidoptera: Crambidae) / Adriana de Lima Mendonça, 2009.
72 f. : il., grafs.

Orientadora: Ruth Rufino do Nascimento.

Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2009.

Bibliografia. f. 62-72.

1. Cana-de-açúcar. 2. *Diatrea flavipennella*. 3. Feromônio sexual. 4. Lepidoptera. I. Título.

CDU: 595.78



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**
Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389
www.cpgqb@qui.ufal.br

Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970
Maceió-AL
Brasil

Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de Adriana de Lima Mendonça intitulada: “Estudo do Comportamento Reprodutivo e Identificação do Feromônio Sexual da Broca da Cana-de-Açúcar *Diatraea flavipennella*, Box, 1931 (Lepidoptera: Crambidae)”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 06 de março de 2009, às 9h na sala de aula do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Ruth Rufino do Nascimento

Prof.^a. Dr.^a. Ruth Rufino do Nascimento
Orientadora – PPGQB/IQB/UFAL

Renildo Barros
Prof. Dr. Renildo Barros
CFRPE

Aldenise Alves Moreira
Prof.^a. Dr.^a. Aldenise Alves Moreira
UESB

Cyrolino Cabral Junior
Prof. Dr. Cyrolino Cabral Junior
FANUT/UFAL

Denise Maria Pinheiro
Prof.^a. Dr.^a. Denise Maria Pinheiro
IQB/UFAL

A Deus, acima de tudo.

Agradeço.

Aos meus pais Francisco e Sueli, por serem os responsáveis pela minha caminhada, e aos meus irmãos, Alana e Rodrigo, pelo apoio incondicional e fraterno.

Dedico.

Ao meu esposo Raul, pelo amor e incentivo constantes, e a minha princesa Júlia, mais uma benção dada a mim por Deus.

Ofereço.

As instituições

Este trabalho contou com o apoio estrutural e financeiro das seguintes instituições: Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A todas, o meu muito obrigado.

Agradecimentos

A Prof^a Dr^a **Ruth Rufino do Nascimento** (IQB-UFAL), pela orientação, esforço, compreensão, amizade e companheirismo em todos os momentos, compartilhando as dificuldades e sucessos deste trabalho;

Ao Prof^o Dr^o **Cyro Rêgo Cabral Júnior** (FANUT-UFAL), pela amizade bem como pelas idealizações, sugestões e auxílio nas análises estatísticas deste trabalho;

Ao Prof^o Dr^o **Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana** (IQB-UFAL) pela amizade e apoio fundamental dado durante todo meu mestrado e doutorado e em muitos momentos deste trabalho;

Aos amigos do laboratório de Ecologia Química, **Auridete Maria de Oliveira Correia, Fernando Lucas Torres de Mesquita, Rousseau da Silva Campos; Ana Paula Pereira da Fonseca, José Joubert Gonçalves de Alencar, Jeinny Cristine Gomes dos Santos, Carlos Eduardo da Silva, Maria do Rosário T. de Freitas e Diogo Ferro de Moura Sales**, por toda amizade, ajuda, compreensão, carinho e companheirismo, compartilhando comigo essa caminhada que acima de tudo é nossa;

Ao Sr. **José de Souza Santos**, pela colaboração constante e essencial durante todas as etapas do nosso estudo com *Diatraea flavipennella*;

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia** pelos ensinamentos transmitidos a mim durante o curso;

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia** por me inserir no campo científico.

Sumário

| | Página |
|---|--------|
| Lista de figuras..... | i |
| Lista de tabelas..... | iv |
| Resumo..... | v |
| Abstract..... | vi |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 2. Objetivos..... | 3 |
| 3. Revisão de Literatura..... | 4 |
| 3.1. Distribuição Geográfica de <i>Diatraea</i> spp..... | 4 |
| 3.2. Danos e importância econômica..... | 5 |
| 3.3. Ciclo biológico de <i>D. flavipennella</i> | 7 |
| 3.4. Controle de <i>Diatraea</i> spp..... | 8 |
| 3.5. Comportamento reprodutivo..... | 10 |
| 3.6. Comunicação química..... | 11 |
| 3.7. Feromônios sexuais de lepidópteros..... | 12 |
| 3.8. Feromônios sexual de <i>Diatraea</i> spp..... | 13 |
| 3.9. Procedimentos utilizados para extração, isolamento e identificação de feromônio de insetos..... | 14 |
| 3.9.1. Coleta de material..... | 14 |
| 3.9.2. Concentração dos extratos..... | 16 |
| 3.9.3. Cromatografia gasosa acoplada a detector eletroantegráfico (GC-EAD)..... | 17 |

| | |
|---|----|
| 3.9.4. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)..... | 20 |
| 3.9.5. Cromatografia gasosa bidimensional (CG-CG) acoplada a espectrometria de massas (EM) com detector “time-of-flight” (TOF)..... | 22 |
| 3.9.6. Reações de micro-derivatizações..... | 25 |
| 3.10. Emprego dos feromônios..... | 26 |
| 3.11. Perspectivas atuais do MIP através do uso de feromônios..... | 31 |
| 4. Material e Método..... | 33 |
| 4.1. Insetos..... | 33 |
| 4.2. Bioensaios para observações de comportamento reprodutivo..... | 35 |
| 4.3. Extração do feromônio sexual de <i>D. flavipennella</i> | 37 |
| 4.4. Isolamento e identificação do feromônio sexual de <i>D. flavipennella</i> | 39 |
| 4.4.1. Cromatografia Gasosa acoplada a Eletroantenografia (CG-EAG)..... | 39 |
| 4.4.2. CG x CG-TOF-EM..... | 41 |
| 4.5. Compostos químicos | 42 |
| 4.6. Determinação da posição da dupla ligação em moléculas de feromônio: Metiltiulação..... | 42 |
| 4.7. Bioensaios para verificar a eficiência da mistura feromonal..... | 43 |
| 4.8. Delineamento Experimental dos bioensaios com feromônios..... | 43 |
| 4.9. Análises Estatísticas..... | 44 |
| 5. Resultados..... | 45 |
| 5.1. Comportamento de chamamento, corte e acasalamento de adultos de <i>D. flavipennella</i> | 45 |

| | |
|---|----|
| 5.2. Periodicidade de chamamento de fêmeas de <i>D. flavipennella</i> | 46 |
| 5.3. Frequência de acasalamento entre adultos de <i>D. flavipennella</i> | 47 |
| 5.4. Análises por CG-EAG e CG x CG-TOF-EM..... | 48 |
| 5.5. Análise comportamental, em laboratório, do feromônio sexual de <i>D.</i> <i>flavipennella</i> | 53 |
| 6. Discussão..... | 55 |
| 7. Conclusão..... | 61 |
| 8. Referências bibliográficas..... | 62 |

Lista de Figuras

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1: Localização de <i>Diatraea</i> spp. em regiões de canaviais de Alagoas: A- Marituba; B- Seresta; C- Cansanção de Sinimbu; D-Triunfo; E- Sumaúma; F-Terra Nova; G-Cachoeira and H-São Luís do Quitunde.... | 5 |
| Figura 2: Danos provocados por <i>Diatraea</i> spp. em cana de açúcar, onde: (A): danos na folha causados por lagartas jovens; (B) danos provocados no interior da cana e (C) sintoma “coração morto” apontado pela seta (morte da gema apical) da planta..... | 6 |
| Figura 3: Diferença morfológica entre <i>D. sacharallis</i> e <i>D. flavipennella</i> (cápsula cefálica mais clara)..... | 7 |
| Figura 4: Fases do ciclo de vida de <i>D. flavipennella</i> em condições de laboratório, A – Massa de ovos; B – Larvas; C – pupas; e D – adultos (Fonte: Freitas et al., 2007)..... | 8 |
| Figura 5: Espermatóforos (seta) contidos no interior da bursa copulatrix do trato reprodutivo de fêmeas de mariposas. A bursa “D” contém dois espermatóforos, indicando que a fêmea re-acasalou..... | 11 |
| Figura 6A: Esquema de um CG-EAG (Fonte: Syntech, 2004)..... | 19 |
| Figura 6B: Cromatograma obtido de uma análise por CG-EAG. (Fonte: Syntech, 2004)..... | 19 |
| Figura 7: Preparação da antena para EAG..... | 21 |
| Figura 8: (A) Espectro de massa – Impacto eletrônico-IE-; (B) espectro de massa – Ionização Química-IQ- do feromônio sexual de <i>H. occidentalis</i> (extraído de Zarbin, 2001)..... | 23 |

| | |
|---|----|
| Figura 9: Diagrama básico de um sistema CG x CG onde: (a) injetor, (b) coluna primária, (c) conectores de coluna, d) interface CG x CG, (e) coluna secundária, (f) detector e (g) divisão opcional para um forno secundário (extraído de Dmandja, 2004) | 24 |
| Figura 10: Esquema de picos de um cromatograma em duas dimensões (CC x CG) (extraído de Dmandja, 2004)..... | 25 |
| Figura 11: Sequência de derivatizações realizadas para a preparação do hidrocarboneto correspondente ao feromônio de <i>H. occidentalis</i> (Extraído de Zarbin, 2001)..... | 27 |
| Figura 12: Armadilha do tipo Delta ® utilizada para <i>E. aurantiana</i> (extraído de Bento, 2001)..... | 28 |
| Figura 13: Técnica do confundimento..... | 29 |
| Figura 14: Diferença morfológica da genitália de machos e fêmeas de <i>D. flavipennella</i> destacando o Poró Genital (PG) encontrado em machos e ausente nas fêmeas desta espécie (Extraído de Freitas <i>et al.</i> , 2007). | 34 |
| Figura 15: Etapas da criação de <i>D. flavipennella</i> , onde (A): ovos e lagartas de 1º instar; (B) lagartas acima do 3º instar, (C) pupas sobre algodão umedecido e (D) insetos adultos no interior da câmara de acasalamento (tubo de PVC), forrada com papel vegetal, suprida com algodão embebido em solução de sacarose a 10%. | 35 |
| Figura 16: Etapas da extração da glândula feromonal. (A) fêmea de <i>D. flavipennella</i> , (B) Corte na região abdominal, (C) Adição de solvente, (D) transferência para ampola e (E) selagem | 38 |
| Figura 17: Cromatógrafo gasoso (IOCHB)..... | 39 |

| | |
|--|----|
| Figura 18: Detector Eletroantegráfico (IOCHB) com ênfase para os microeletrodos onde estão inseridas as antenas das mariposas..... | 40 |
| Figura 19: CG-CG (LECO Pegasus 4D)-TOF-EM..... | 42 |
| Figura 20: (A) Cópula; (B) Afastamento do macho ao término da cópula... | 45 |
| Figura 21: Superfície de resposta demonstrando o Número de fêmeas exibindo o comportamento de chamamento (NFCC). Na equação, os símbolos: * e ** indicam significância estatística pelo teste de Student ($p < 0.05$ e $P < 0.01$, respectivamente). Diferentes cores representam diferentes intervalos de interação fatorial entre a hora da escotofase (T) e idade das fêmeas (I) para NFCC..... | 47 |
| Figura 22: Frequência de acasalamento utilizando diferentes razões sexuais de adultos de <i>D. flavipennella</i> . Escores médios seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com os testes seguintes: Teste de Kruskal Wallis ($p < 0.05$), e teste de Nemenie ($p < 0.05$)..... | 48 |
| Figura 23: Análises por CG-EAG de extratos de <i>D. flavipennella</i> com 5 fêmeas equivalentes (FE) mostrando as áreas proeminentes de resposta... | 49 |
| Figura 24: Análise tridimensional, por CG x CG-TOF-EM, de 1 μ L de extratos de <i>D. flavipennella</i> . As áreas em coloração alaranjada mostram os picos ativos em EAG..... | 50 |
| Figura 25: Registro de CG-EAG para solução de DF1..... | 52 |
| Figura 26: Registro de CG-EAG para solução de DF2..... | 52 |
| Figura 27: Etapas para obtenção do feromônio sexual de <i>D. flavipennella</i> ... | 60 |

Lista de Tabelas

| | Página |
|---|---------------|
| Tabela 1: Áreas de cultivo de cana-de-açúcar onde foram conduzidas as coletas das espécies de <i>Diatraea</i> spp. e seus respectivos municípios e coordenadas..... | 5 |
| Tabela 2: Área percentual dos compostos feromonais de <i>D. flavipennella</i> (os quais foram ativos em GC-EAG) e sintéticos, DF ₁ e DF ₂ em análises por CG x CG-TOF-EM..... | 51 |
| Tabela 3: Médias obtidas na comparação entre as misturas de compostos testados..... | 54 |

Resumo

Diatraea flavipennella (Lepidoptera: Crambidae), comumente denominada broca da cana-de-açúcar, representa um dos principais problemas da cana-de-açúcar. Este trabalho objetivou a extração e identificação do feromônio sexual desta espécie para fins de controle desta praga no MIP. Para tanto, foram preparados extratos da glândula produtora de feromônio sexual, a qual foi retirada de fêmeas em chamamento (1-2 dias de idade) e lavada em hexano (20 fêmeas/200 μ L). Os mesmos foram enviados para Institute of Organic Chemistry and Biochemistry da Academia Tcheca de Ciências, localizado em Praga, República Tcheca, para fins de identificação dos componentes do feromônio sexual por cromatografia gasosa acoplada à eletroantenografia (CG-EAG) e cromatografia bidimensional acoplada à espectrometria de massas (CG x CG-TOF-EM), incluindo reações de derivatização com DMDS. Após a identificação, foram conduzidos testes etológicos, no laboratório de ecologia química, com a mistura feromonal. Os bioensaios foram conduzidos sob condições de laboratório ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$, $80\%\pm 10\%$.U.R., intensidade de iluminação $3,5\text{ W/m}^2$, escotofase, lâmpada vermelha de 15W), em arena de vidro (14,8cm x 30cm x 20,3cm). Nesta, cinco machos foram submetidos a papel de filtro impregnado com a mistura e seus comportamentos registrados por 20 minutos. Os resultados das análises por CG-EAG e CG x CG-TOF-EM revelaram que fêmeas de *Diatraea flavipennella* produzem uma mistura feromonal, a qual é constituída de compostos oxigenados e insaturados denominados DF1 e DF2, nas proporções de 3:1. Esta mistura eliciou em machos uma resposta comportamental semelhante a fêmeas vivas coespecíficas.

Abstract

The reproductive behavior, extraction and identification of the sex pheromone of *Diatraea flavipennella*, was investigated by means of behavioral bioassays and chemical analysis by GC-EAD and GC x GC-TOF-MS. The results showed that calling females showed the following behaviours: opening wings, antennae laterally directed upwards, lifting and tilting the abdomen with exposure of pheromone-producing gland. On the other hand, the behavior exhibited by coespecific male is: oriented flight, opening the wings and claspers, landing on the back of the female abdomen, genital contact and copulation followed by subsequent 180° body turn. Copulation time averaged 100,5 min. ± 18,16 min. Females started calling activity at the second hour of the scotophase and continued for a 10-h period. The maximal calling activity was observed at the ninth hour of the scotophase in 2-3 days-old virgin females. Females of *D. flavipennella* mated only once. The results from GC-EAD and GC x GC-TOF-MS analyses of the virgin females extracts showed that the sex pheromone mixture is composed of oxygenated and unsaturated compounds in the proportions of 3:1. This mixture elicited in *D. flavipennella* males a behaviour similar to the one they showed in the presence of a live co-specific female.

1. Introdução

A cultura da cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum*, Linnaeus, 1753, (Gramineae) é uma das mais importantes no contexto sócio-econômico no mundo, ocupando as primeiras posições em termos de produção mundial. O Brasil lidera a lista dos 80 países produtores, respondendo por 25% da produção mundial e 8,9 milhões de hectares de área cultivada e previsão de safra de 558 milhões de toneladas de cana-de-açúcar para 2009 (CONAB, 2008).

Na região Nordeste, o Estado de Alagoas destaca-se como o maior produtor, com uma produtividade de 24.685.900 toneladas de cana própria, contribuindo com percentuais de 64,5% na produção de açúcar e 68,14% da produção de álcool (Sindaçúcar, 2008).

O inseto-praga *Diatraea flavipennella* Box, 1931 (Lepidoptera: Crambidae), comumente denominada broca pequena da cana-de-açúcar, faz parte do complexo de brocas pertencentes ao gênero *Diatraea*, o qual representa um dos principais problemas entomológicos da cana-de-açúcar.

A distribuição e dominância das espécies do gênero *Diatraea* no Estado de Alagoas apresentaram, ao longo dos anos, uma grande variação. Os resultados das pesquisas conduzidas nos anos de 1975 e 1976 demonstraram que, nessa época, a dominância específica de *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera: Crambidae), sobre sua semelhante *D. flavipennella* apresentava índices de 70,12% e 29,88%, respectivamente (Risco *et al.*, 1976).

Em 1985, os trabalhos realizados pelo Setor de Entomologia do extinto PLANALSUCAR revelaram uma inversão no status destas duas pragas, tendo sido observado que a espécie *D. flavipennella* começava a aparecer em várias localidades do Estado, como espécie dominante, com percentuais de até 89,80%, em oposição a *D. saccharalis* (10,20%).

Conforme o exposto, o relato da inversão da densidade populacional de *D. saccharalis* e *D. flavipennella* não foi considerado por um longo período, até que experimentos de campo, empregando armadilhas contendo iscas atrativas para machos de *D. saccharalis* apontaram um declínio desta espécie no campo (Do Nascimento, dados não publicados, 2002), demonstrando, dessa forma a

necessidade urgente de se efetuar um estudo mais detalhado sobre a ocorrência, dominância, biologia, ecologia, plantas hospedeiras, inimigos naturais e importância econômica de *Diatraea* spp. encontrada em Alagoas e demais estados produtores de cana-de-açúcar no Brasil.

Estudos recentes referentes à ocorrência e distribuição do gênero *Diatraea*, realizados em oito áreas de cultivo de diferentes regiões canavieiras do Estado de Alagoas, conduzidos no período de setembro/2003 a fevereiro/2004 pelo Laboratório de Ecologia Química/IQB/UFAL, revelaram que apenas 2,33% das lagartas coletadas pertenciam à espécie *D. saccharallis* em oposição a 97,67% pertencentes a *D. flavipennella* (Freitas, *et al*; 2006). Evidenciando-se uma dominância desta sobre a primeira em todas as áreas levantadas corroborando, dessa forma, com os dados do PLANALSUCAR, publicados em 1985, sobre a inversão populacional entre estas espécies.

Informações referentes aos aspectos bioecológicos, danos e sintomatologia foram registrados, para o gênero, no entanto, poucas referências, cientificamente comprovadas e atualizadas, são alusivas apenas à espécie *D. flavipennella*. Pesquisas conduzidas recentemente pelo Grupo de Ecologia Química (LEQ/UFAL) determinaram os aspectos relacionados a biologia deste inseto, em condições de laboratório (Freitas *et al*; 2007).

Diante do exposto, esta pesquisa teve por objetivo dar continuidade aos estudos desenvolvidos com esta praga, no que se refere ao estudo do seu feromônio sexual. Para tanto, como a primeira etapa deste processo, foi realizado o estudo do seu comportamento reprodutivo e posteriormente a extração e identificação do seu feromônio sexual, bem como a avaliação de sua eficiência em condições de laboratório. Tais informações podem ser empregadas no manejo integrado desta praga, onde o controle biológico pode ser combinado com a técnica de monitoramento ou supressão de machos, através do emprego de armadilhas contendo formulações do feromônio sexual.

2. Objetivos

- (i) Descrever as etapas do comportamento de corte e acasalamento da *D. flavipennella*,
- (ii) Verificar o pico, periodicidade e idade de chamamento de fêmeas de *D. flavipennella*,
- (iii) Definir a frequência de acasalamento desta espécie,
- (iv) Extrair os constituintes do feromônio sexual liberado por fêmeas virgens de *D. flavipennella*;
- (v) Identificar, através das técnicas de Cromatografia Gasosa acoplada a Eletroantenografia (CG-EAG) e Cromatografia gasosa unidimensional e Bidimensional (CG x CG) acoplada a espectrometria de massas (EM) com detector "Time of Flight" (TOF), os componentes do feromônio sexual,
- (vi) Avaliar a eficiência do feromônio sexual em bioensaios de laboratório.

3. Revisão de Literatura

3.1. Características Gerais do gênero *Diatraea*.

O gênero *Diatraea* é representado por aproximadamente 21 espécies, formando um complexo de brocas que ataca culturas no Continente Americano. Entretanto nem todas as espécies provocam danos de importância econômica ao cultivo comercial. No Brasil, ocorrem duas espécies que atacam a cana-de-açúcar: *D. sacharallis*, apresentando distribuição generalizada em todo país e *D. flavipennella*, encontrada nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, e seis estados do nordeste, a saber: Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia onde atacam culturas de grande importância econômica (Mendonça, 1996).

D. sacharallis, também conhecida como broca do colmo ou da cana, é a espécie de maior importância do gênero. É nativa do hemisfério norte e pode ser encontrada em canaviais da Argentina, Bolívia, Colômbia, EUA, México, Panamá, Peru, Haiti, Jamaica, Paraguai, República Dominicana, Venezuela e Antilhas Menores (Guagliumi, 1972, Mendonça, 1996). Esse gênero pode ainda provocar danos a outras culturas, como milho, trigo, arroz, sorgo, napier e outras gramíneas e ciperáceas (Wedell, 2005).

Em Alagoas, a ocorrência de insetos do gênero *Diatraea* em campos de cana de açúcar foi investigada em 8 diferentes zonas edáficas (tabela 1) durante o período de Setembro de 2003 e fevereiro de 2004 (figura 1). Este estudo demonstrou que os percentuais de *D. saccharalis* e *D. flavipennella* eram de 2,33% e 97,67%, indicando que ocorre uma prevalência de *D. flavipennella* no Estado (Freitas, et al; 2006).

Tabela 1: Áreas de cultivo de cana-de-açúcar onde foram conduzidas as coletas das espécies de *Diatraea* spp. e seus respectivos municípios e coordenadas

| Usina | Município | Coordenadas | Altitude | Temperatura |
|-------------------------|----------------------|--------------------------------|----------|-------------|
| A: Marituba | Igreja Nova | 10° 07' 31"S / 36° 37' 43"W | 14 m | 22 - 37°C |
| B: Seresta | Teotônio Vilela | 09° 54' 19"S / 36° 21' 10"W | 156 m | 20 - 35°C |
| C: Cansanção de Sinimbu | Jequiá da Praia | 10° 07' 32"S / 36° 10' 32"W | 16 m | 20 - 34°C |
| D: Triunfo | Boca da Mata | 09° 38' 29"S / 36° 13' 13"W | 132 m | 22 - 37°C |
| E: Sumaúma | Marechal Deodoro | 09° 42' 37"S / 35° 53' 42"W | 31 m | 22 - 29°C |
| F: Terra Nova | Pilar | 09° 35' 50"S / 35° 57' 24"W | 13 m | 22 - 37°C |
| G: Cachoeira | Maceió | 09° 39' 57"S / 35° 44' 07"W | 16 m | 24 - 29°C |
| H: Santo Antônio | São Luís do Quitunde | 09° 19' 06"S / 35° 33' 40"W | 4 m | 19 - 33°C |

(Extraído de Freitas *et al.*, 2005)

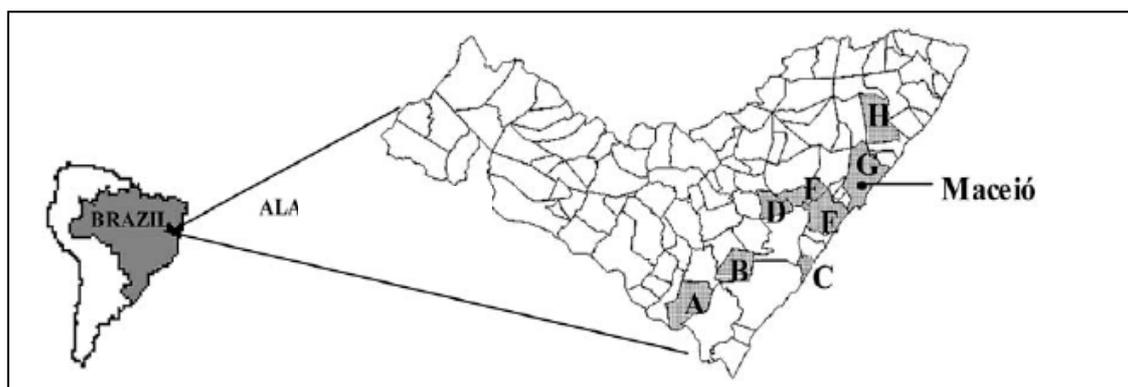


Figura 1: Localização de *Diatraea* spp. em regiões de canaviais de Alagoas: A- Marituba; B- Seresta; C- Cansanção de Sinimbu; D- Triunfo; E- Sumaúma; F- Terra Nova; G- Cachoeira e H- Santo Antônio. (Extraído de Freitas *et al.*, 2006).

3.2. Danos e importância econômica

Os danos provocados por estas pragas à cana-de-açúcar podem ser classificados em diretos e indiretos. Os danos diretos advêm da ação alimentar das lagartas, as quais ao eclodirem, penetram no colmo de canas novas de até quatro meses de idade, alimentando-se das partes mais tenras na base do cartucho ou na região nodal, causando a morte da gema apical, principal sintoma do ataque da praga, conhecido como “coração morto” ou “olho morto”, provocando, conseqüentemente a morte da planta.

Na cana adulta, as perfurações e galerias formadas pelo consumo da planta, causam brotações laterais, enraizamento aéreo, perda de peso, afinamento do colmo, atrofia de entrenós e morte da planta.

No entanto, são os danos indiretos os que mais causam prejuízos agroindustriais, os quais se caracterizam pela penetração dos agentes fitopatogênicos nos orifícios e rachaduras deixadas pelas lagartas no colmo da planta. As espécies de fungo *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum* são os principais agentes causadores da doença conhecida como podridão vermelha, a qual resulta da produção de micotoxinas pelos fungos e que provoca a inversão da sacarose diminuindo a pureza do caldo durante o processo de fermentação alcoólica (Gallo, *et al*; 2002) (figura 2).

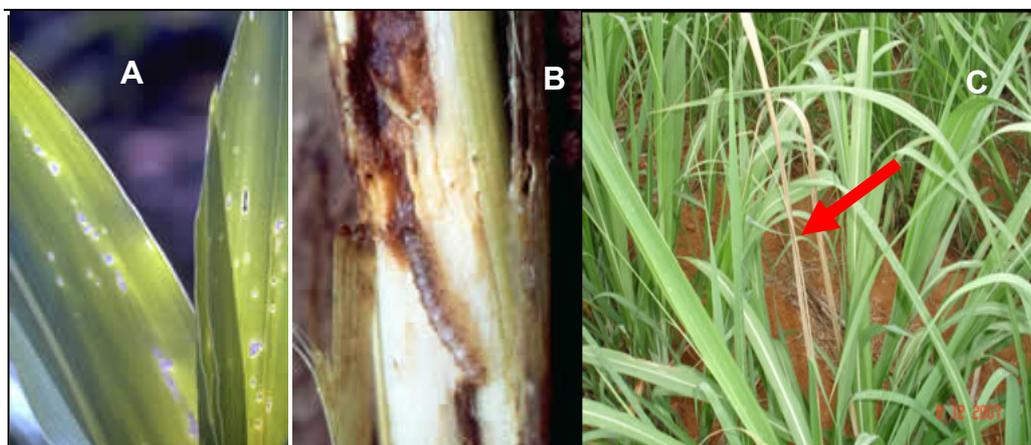


Figura 2: Danos provocados por *Diatraea* spp. em cana de açúcar: (A): danos na folha causados por lagartas jovens; (B) danos provocados no interior da cana e (C) sintoma “coração morto” apontado pela seta (morte da gema apical) da planta.

Além da penetração de fungos de campo, há também a ação secundária de coleobrocas como *Metamasius hemipterus*, *Xyleborus* spp. e *Sphenophorus* spp., que contribuem para aumentar o dano (Contreras, 1980).

Os prejuízos provocados por estas brocas variam em função de vários fatores, principalmente as estações do ano, a variedade e estágio fenológico da cultura atacada.

No Brasil, um dos métodos de quantificação de dano é através da determinação de intensidade de infestação. Esta, por sua vez, é determinada através da amostragem de colmos que são abertos longitudinalmente e empregados na contagem do número total de internódios brocados.

A cada 1% de intensidade de infestação (I) da praga, ocorre prejuízo de 0,25% de açúcar, 0,20% de álcool e 0,77% de peso, sendo que os prejuízos são ainda maiores em cana planta (Gallo, *et al*, 2002). Estima-se que ocorre uma perda média de 62 litros de álcool por hectare a cada 1% de internódios brocados (Lopes *et al*, 1983).

No Estado do Mato Grosso do Sul, por exemplo, foram moídas 11.635.093 toneladas de cana e produzidas 574.009 toneladas de açúcar e 640.843.000 milhões de litros de álcool, dos quais, 207.153 milhões de litros de álcool anidro e 433.690 milhões de litros de álcool hidratado. Levando em consideração a produção anual de cana e o índice médio de infestação de brocas nos canaviais do Estado, na faixa de 4%, ocorre uma diminuição anual na produção de açúcar na ordem de 220 toneladas/ano (Canaoeste, 2009). Estes dados relativos ao álcool são extremamente importantes, principalmente devido ao aumento do seu uso como biocombustível. Estima-se que o seu consumo alcance 19,4 bilhões de litros na safra de 2008/2009 ou seja, cerca de 3,7 bilhões a mais que a safra 2007/2008 (Jornal da cana, 2007).

3.3. Descrição e Biologia

A diferença morfológica básica entre *D. sacharallis* e *D. flavipennella* está basicamente na coloração da cápsula cefálica presente na fase larval (figura 3) (Mendonça, 1996).



Figura 3: Diferença morfológica entre *D. sacharallis* (A) e *D. flavipennella* (B) (cápsula cefálica mais clara).

Os adultos apresentam coloração branco-leitosa e asas estriadas, com um ponto negro central nas anteriores. As lagartas passam por sete instares larvais, durando em média 34 dias e atingem de 25 a 30 mm de comprimento.

Apresentam coloração amarelada e pontuações ou manchas castanhas, dispostas de forma desuniforme, sem dar a impressão de formação de linhas no dorso.

A cápsula cefálica é de cor amarela ou marrom amarelada. O período de pupa dura em média 12,75 dias, exibindo dimorfismo sexual. As fêmeas são maiores do que os machos, enquanto estes últimos exibem um poro genital o qual é ausente em fêmeas. Nos insetos adultos, a proporção de macho:fêmea é de 1:1,3. As fêmeas adultas têm envergadura média de 28,73cm enquanto que os machos são menores, possuindo envergadura média de 20,80cm.

A longevidade do adulto é, em média, sete (7) dias. A oviposição inicia-se no primeiro dia de vida da fêmea e estende-se até o sexto dia, com média de 431, 05 ovos, apresentando uma maior produção destes nos primeiros dias de vida. dispostos de forma imbricada, geralmente no limbo foliar e com mais freqüência na parte dorsal da folha. O período de incubação dos ovos varia de 4 a 7 dias (Freitas, et al; 2007) (figura 4).

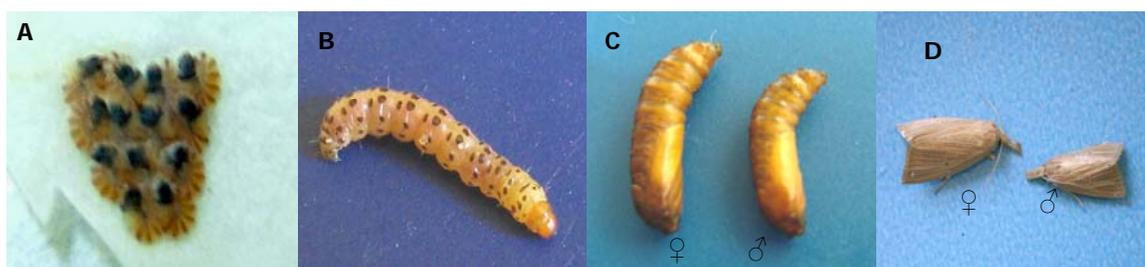


Figura 4: Fases do ciclo de vida de *D. flavipennella* em condições de laboratório: A – Massa de ovos; B – Larvas; C – pupas; e D – adultos (Fonte: Freitas et al., 2007)

3.4. Controle de *Diatraea* spp.

Em Entomologia, praga é o inseto que causa danos econômicos nas áreas florestais, agropecuárias e urbanas, podendo ser vetor de enfermidades às plantas, aos animais e ao homem (Parra *et al*; 2002).

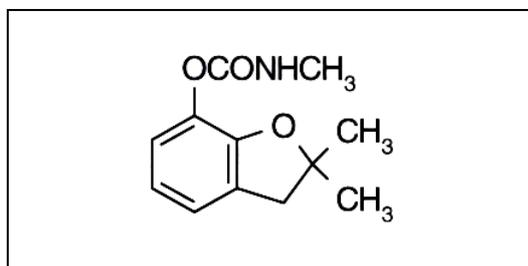
A ocorrência de pragas é um problema grave para a agricultura, acarretando sérias conseqüências ao setor produtivo, sendo um deles, o aumento no uso de agrotóxicos nocivos ao ambiente.

Segundo Unnithan & Paye (1991) o sistema mais adequado ao controle de pragas se baseia no manejo integrado com a utilização de métodos harmoniosos como técnicas diferentes, aplicadas levando-se em conta princípios ecológicos, econômicos e sociais objetivando manter o inseto-praga

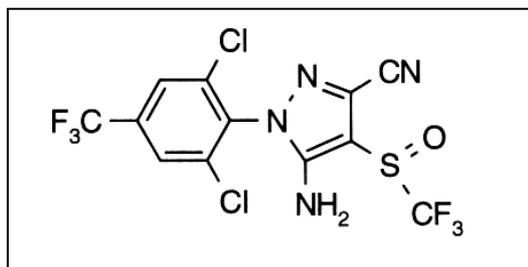
abaixo do nível de dano econômico. Existem algumas técnicas utilizadas atualmente, a saber:

i) Controle cultural: Baseado no uso de variedades resistentes ou tolerantes ao ataque da broca, corte da cana, moagem rápida e eliminação das plantas hospedeiras nas proximidades do canavial (Gallo *et al*; 2002). A queimada da cana reduz em mais de 95% sua população, enquanto uma parcela significativa de parasitóides, e principalmente predadores sobrevivem a este evento (Degaspari *et al*; 1983).

ii) Controle químico: Os inseticidas registrados para o controle de *D. sacharalis* são o carbofuran [1] e o fipronil [2]. Estes inseticidas têm um modo de ação único e exclusivo, devido à especificidade e precisão do local atingido no Sistema Nervoso Central (SNC) dos insetos. Estas substâncias químicas inibem o Ácido Gama Amino Butílico, uma substância que controla o fluxo de íons cloro através da membrana da célula nervosa dos insetos levando os insetos à morte (Brasil, 2006). A eficiência deste controle é influenciada pela dificuldade de se atingir a lagarta e pelos casos de resistência a pesticidas (Risco *et al*; 1975).



[1] 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbarnato



[2] (RS)-5-amino-1-(2,6-dicloro-alfa,alfa,alfa-trifluor-p-tolil)-4-trifluormetilsulfinilpirazol-3-carbonitrila

iii) Controle biológico: Tem sido a ferramenta mais eficiente para combater ou minimizar os danos causados por espécies do gênero *Diatraea*. Este controle é feito utilizando o parasitóide de lagartas introduzido no Brasil, *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). Tal técnica vem sendo utilizada com sucesso e eficácia desde 1974, quando foi implantado no Brasil, o programa nacional de controle integrado destas pragas (PLANALSUCAR) pelo extinto Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA), constituindo-se no maior programa de controle biológico do mundo, com aproximadamente 50 laboratórios de produção de *C. flavipes* em todo o país (Mendonça, 1996).

iv) Controle por comportamento: Toda racionalização de controle de pragas deve ser baseada no conhecimento de sua biologia e seu comportamento dentro do ecossistema em que vive. O conhecimento do hábito reprodutivo de um inseto-praga contribui efetivamente para um maior sucesso no seu controle (Ferreira & Correia; 2001).

Estes conhecimentos propiciam dados que podem aumentar a eficiência do controle biológico indicando inclusive a melhor época de liberação de parasitóides, podendo levar a utilização de armadilhas que possam monitorar e controlar a população através da captura de machos, evitando o acasalamento desta espécie e conseqüentemente, diminuindo a sua população.

3.5. Comportamento reprodutivo

Em lepidópteros, a decisão pelas fêmeas para machos ou não, é influenciada por muitos fatores que dependem do seu estágio de maturação. Machos, por sua vez, exibem comportamento de corte antes do acasalamento. Tanto em borboletas como em mariposas, os machos cortejam fêmeas antes do acasalamento. Os atraentes sexuais ou afrodisíacos, liberados por machos de borboletas e fêmeas de mariposas são empregados na estimulação da cópula (Arnqvist & Nilsson, 2000).

Estes odores são liberados por estruturas especializadas, tais como: pincéis, coremata e ovipositores modificados (Arnqvist & Nilsson, 2000). Os feromônios liberados podem fornecer informações sobre a identidade da espécie e qualidade do inseto.

Em borboletas da espécie *Pieris napi* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pieridae), são os machos que liberam um composto volátil sexo-específico

(citral) durante a corte, o qual estimula a fêmea a aceitar a cópula (Andersson *et al*; 2003). Em muitas espécies de mariposas, são os feromônios liberados pelas fêmeas que possuem uma importante função no reconhecimento da espécie (Roelofs & Cardé, 1974) indicando que a comunicação química entre os sexos é um importante componente do comportamento de corte e acasalamento. Em geral, as fêmeas liberam moléculas odoríferas para atraírem os machos a longa distância (Wedell, 2005).

A reprodução nas fêmeas também está associada com o sucesso na transferência de esperma. Em muitas espécies de lepidópteros, a presença de esperma na espermateca (órgão de estocagem de esperma da fêmea) é requerido para cessar a receptividade bem como estimular a oviposição (Karube & Kobayashi, 1999).

Fêmeas maximizam o sucesso reprodutivo pela maximização do número de ovos produzidos. A assimetria básica entre os sexos sugere que machos aumentam a aptidão monotomicamente com o aumento do número de acasalamentos, enquanto um ou poucos acasalamentos são suficientes para fêmeas maximizarem seu sucesso reprodutivo. Assim, as fêmeas podem acasalar com diferentes machos (poliandria) e várias vezes com o mesmo macho (acasalamento repetido) (Yasui, 1998).

O esperma de lepidópteros está contido no interior de uma camada protéica chamada “espermatóforo” o qual é transferido intacto para a fêmea. Após o acasalamento ele permanece dentro de um órgão da fêmea chamado bursa copulatrix (Arnqvist & Nilsson, 2000) (figura 5).

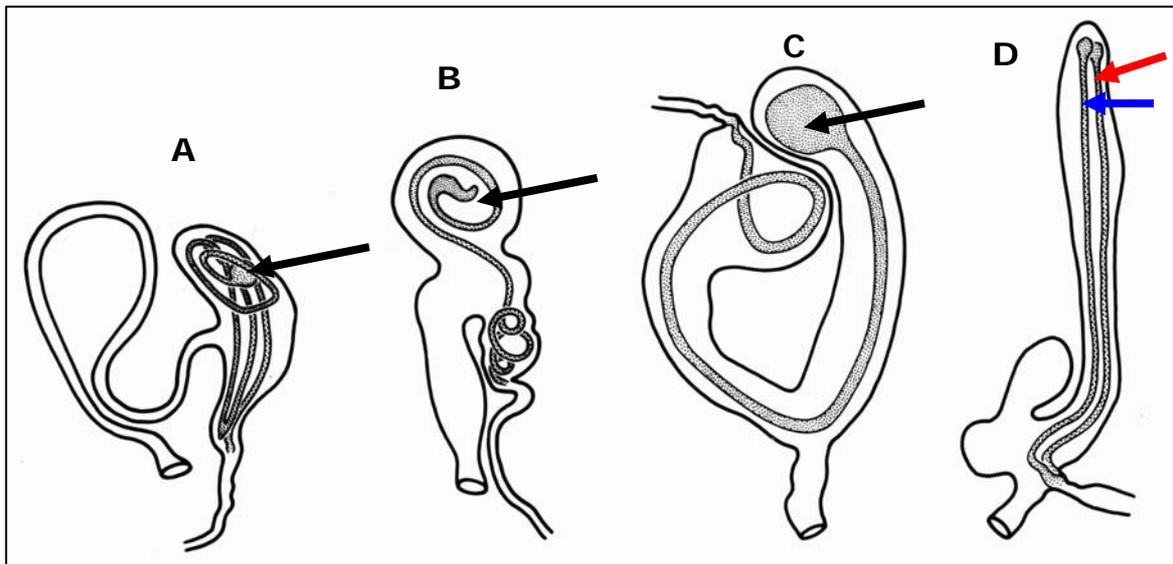


Figura 5: Espermatóforos (seta) contidos no interior da bursa copulatrix do trato reprodutivo de fêmeas de mariposas. A bursa "D" contem dois espermatóforos, indicando que a fêmea re-acasalou.

3.6. A Comunicação química

O papel da comunicação química no comportamento reprodutivo de lepidópteros noturnos está bem estabelecido. Na maioria das espécies, as fêmeas emitem e os machos respondem a uma combinação de substâncias voláteis, denominada feromônio sexual (Roelofs & Cardé, 1977, Tamaki & Gilbert, 1985).

Espécies de mariposas tais como: *Carmenta* sp. e *Pennisetia marginata*, mantêm o isolamento reprodutivo através de diferenças químicas em seus feromônios sexuais, quando na ausência de outros meios como o isolamento geográfico, sazonal ou temporal (Roelofs & Cardé, 1974, Greenfield & Karandinos, 1979)

Atualmente, os feromônios sintéticos possuem vital importância em sistemas de manejo integrado de pragas (MIP) e, têm sido utilizados largamente no controle populacional de muitas espécies de lepidópteros, em grande parte por meio de emprego da técnica de confundimento sexual. A eficácia desta técnica está diretamente relacionada, dentre outros fatores, à densidade populacional e ao comportamento reprodutivo do inseto-alvo (Cardé & Minks, 1995). O sucesso com a implementação dessa estratégia de controle, embora com algumas restrições, são reportadas para lepidópteros tais como a

lagarta rosada do algodoeiro *Pectinophora gossypiella* (Saund) (Il'Chev & Milner, 2004).

O entendimento dos mecanismos envolvidos no acasalamento, bem como dos fatores reguladores e seus efeitos no potencial reprodutivo, são essenciais para o desenvolvimento de estratégias de controle que utilizam feromônios sintéticos como interventores no processo reprodutivo de uma praga (Batista *et al*; 2002).

O conhecimento detalhado da comunicação química de uma espécie é importante ao menos sob dois aspectos: (i) pelas interações entre espécies que utilizam compostos químicos na comunicação sexual; (ii) para a utilização de táticas de manejo envolvendo o uso de feromônios. Neste sentido, os vários aspectos da biologia reprodutiva tornam-se parâmetros essenciais para a escolha de armadilhas iscadas com feromônio sexual. Além disso, os compostos da mistura feromonal devem estar na proporção ideal, condição determinante para a eficácia e especificidade na captura dos machos (Lima & Sanchez, 1998).

3.7. Feromônios sexuais de lepidópteros

Os feromônios estão entre as substâncias químicas fisiologicamente mais ativas conhecidas atualmente em insetos por provocarem respostas em concentrações extremamente baixas (Vilela & Della Lucia, 2001).

Várias pesquisas vêm sendo conduzidas pelo Grupo de Ecologia e Comportamento de Insetos da Universidade Federal de Alagoas – UFAL utilizando o *Rincoforol*, feromônio de agregação da broca-do-olho-do-coqueiro, *Rhynchophorus palmarum*, agente transmissor do nematóide causador do “anel-vermelho”, uma doença que mata o coqueiro e se espalha rapidamente por toda a plantação. Este feromônio é sintetizado pela empresa incubada desta universidade, sendo acondicionado em cápsulas de plástico do tipo “eppendorf safe lock ®” contendo um furo de 1(um) mm de diâmetro na tampa, libera no ambiente uma taxa média de 4,3 mg/dia (interacta Química, 2009).

Apesar disto, o maior número de espécies de insetos cujos feromônios têm sido estudados no Brasil pertence à ordem Lepidoptera. A utilização de feromônio sexual em armadilhas adesivas foi eficiente no monitoramento de três importantes pragas pertencentes à família Gelechiidae: a traça do

tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrich) (Attygalle *et al.*, 1995)], a lagarta rosada do algodoeiro, *Pectinophora gossypiella* (Saund) (Il'Chev & Milner, 2004) e a traça da batatinha *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Vilela, 1988).

Atualmente são sintetizados e vendidos comercialmente os feromônios de duas pragas pertencentes a ordem Lepidoptera no Brasil. Estas pragas pertencem à família Tortricidae e consistem no feromônio sexual de: i) *Bonagota cranaodes* (Meyrich), lagarta da macieira cuja identificação do acetato de (3E, 5Z)- dodecadienila foi feita por Unelius *et al.*; (1996); ii) *Ecdytolopha aurantiana* (Lima), bicho furão do citros, cuja identificação foi feita por (Leal *et al.*, 1992); e que vem sendo utilizado para monitoramento (Bento *et al.*; 2001a). Além destas pode ser citada *Grapholita molesta* (Busck), praga de pessegueiro e nectarina, que teve seu feromônio sexual utilizado para estudo de dinâmica populacional e para seu controle (Loeck *et al.*, 1999; Silveira *et al.*, 1981; Salles & Marini, 1989).

3.8. Feromônio sexual de *Diatraea* spp.

Dentre as brocas da cana-de-açúcar, até o presente momento, foram identificados os feromônios sexuais de três espécies do gênero *Diatraea*, a saber:

i) *D. considerata* (Heirich) onde os três aldeídos, (Z)-11-hexadecenal (Z11-16:Ald), (Z)-7-hexadecenal (Z7-16Ald) e (Z)-13-octadecenal (Z13-18Ald), nas proporções de 74:23:3 são produzidos e utilizados pelas fêmeas desta espécie para atração de machos (Gries, *et al.*; 1998). Esta espécie é a principal praga de cana-de-açúcar no México, provocando perdas estimadas de 25% na produção de açúcar (Flores, 1994).

ii) *D. grandiosella* (Dyar), cujo feromônio consiste em (Z)-9-hexadecenal, (Z)-11-hexadecenal, (Z)-9-octadecenal e (Z)-13-octadecenal [35]. É considerada uma das principais pragas do milho em partes dos Estados Unidos e México (Davis *et al.*; 1986).

iii) *Diatraea saccharalis*: (Z)-9-(E)-11-Hexadecadienal (Z9-E11-16:Al) foi identificado por alguns autores como principal componente do feromônio sexual de fêmeas desta espécie (Carney & Liu, 1983; Svatos *et al.*; 2001, Batista, *et al.*; 2002, Santangelo & Correa, 2002). Entretanto, testes de campo revelaram a baixa atratividade deste componente em comparação com fêmeas virgens

(Patrick & Hensley, 1970; Hammond & Hensley, 1971; Perez & Hensley, 1973; Botelho & Mendes, 1978; Almeida, *et al*, 1983). Estes resultados de campo implicaram a possibilidade de alguns compostos adicionais. Análises subsequentes revelaram a presença de hexadecanal (16:Al), (*Z*)-11-hex-11-enal (*Z*11-16Al) e os isômeros *EZ*, *ZZ*, *EE* de 9,11-16Al entre os principais constituintes. A partir destes compostos, somente (*Z*)-11-16:Al e (*Z*)-9-(*Z*)11-16:Al eliciaram respostas em CG-EAG (Batista, *et al*, 2002). Bjostad *et al*, (1996), através de análises de CG-EAG e CG-EM de extratos da glândula feromonal de fêmeas desta espécie, revelaram dois compostos ativos, o (*Z*)-9-(*E*)-11-hexadeca-9,1-dienal e o (*Z*)-11-hexadec-11-enal, na proporção de aproximadamente 10:1. Esta mistura bicomponente foi tão atrativa quanto extratos de fêmeas sugerindo serem estes os principais componentes feromonais para esta espécie.

3.9. Procedimentos utilizados para extração, isolamento e identificação de feromônio de insetos

Os semioquímicos agem em concentrações baixas influenciando quase todos os aspectos da vida dos insetos, tais como alimentação, comportamento sexual, agregação e oviposição. O conhecimento dessas substâncias (feromônios e aleloquímicos), aliado à observação do modo de vida do inseto, serve como um valioso método no manejo e controle de pragas, por meio da manipulação comportamental das mesmas. Existe uma grande variedade de métodos e técnicas para extrair e identificar feromônios. A metodologia mais apropriada vai depender, fundamentalmente, do tipo de material em estudo e da disponibilidade de equipamentos adequados.

O grande entrave para identificação de feromônios está no fato dessas substâncias biologicamente ativas serem produzidos pelos insetos em quantidades extremamente baixas (10^{-6} a 10^{-9} pg) em meio a uma grande quantidade de compostos inativos, porém significativamente semelhantes (Zarbin *et al*, 2001).

Com isso, o processo requer técnicas gerais e procedimentos que permitam obter materiais naturais puros, com bom rendimento. A seguir serão descritos, resumidamente, alguns procedimentos utilizados para extração,

isolamento e identificação de feromônio de insetos. O enfoque será dado às técnicas utilizadas neste trabalho.

3.9.1. Coleta de material

Atualmente, a extração a partir de um pequeno número de insetos, é suficiente para a obtenção dos primeiros dados espectrais da molécula. Para tanto, algumas considerações devem ser observadas a fim de diminuir o esforço e o tempo. A saber (Ferreira & Correia; 2001):

i) O ritmo circadiano dos insetos: feromônios sexuais, que são produzidos por insetos sexualmente maduros e, normalmente, apenas durante um determinado período do dia;

ii) A quantidade de feromônio presente nas glândulas exócrinas dos insetos é um fator limitante na obtenção de amostras para teste. Ex. A fêmea do bicho-da-seda *Bombyx mori* (Linnaeus) (Lepidoptera: Bombycidae) atrai o macho pela liberação de feromônio em quantidade menor do que 1 µg por segundo á grandes distâncias.

iii) Além da grande variedade de moléculas feromonais, algumas substâncias bioativas possuem baixa estabilidade e necessitam de métodos especiais para minimizar a degradação de substâncias no extrato.

iv) A extração eficiente é aquela em que todo material de interesse, ou parte dele, é extraído e os demais são minimizados, sendo neste ponto, a escolha do solvente de extrema importância.

v) Cuidados devem ser tomados para minimizar as contaminações do extrato com fontes diversas tais como: gorduras presentes nas mãos e plásticos.

vi) Produtos naturais variam consideravelmente quanto à estabilidade; vários feromônios sofrem fácil degradação e várias medidas preventivas são exigidas para minimizar os efeitos da degradação.

vii) Para fins de identificação cromatográfica, as amostras devem estar no estado líquido ou gasoso.

A metodologia mais utilizada para coleta de feromônios é a extração por solvente, pois, além da praticidade do método, ela requer um tempo muito menor para a obtenção do material em relação a outras técnicas (aeração, por exemplo) (Zarbin *et al*, 2001).

A extração é efetuada via processo simples de contato do solvente com a superfície do material da amostra. Analitos solúveis na fase orgânica são distribuídos entre a matriz da amostra e o solvente extrator. A eficiência da extração depende das interações químicas entre a substância e o solvente utilizado em relação a solubilidade no tecido. Neste caso, as propriedades físicas do solvente influenciam diretamente na permeabilidade da membrana celular (Ferreira & Correia; 2001).

Além de parâmetros como escolha do solvente, idade, sexo dos indivíduos, período do dia, etc, um extrato pode ser preparado da seguinte forma:

i) Extrato de corpo inteiro/partes do corpo (cabeça, tórax, abdômen): É obtido quando não se sabe a localização da glândula produtora de feromônios ou o inseto é muito pequeno, inviabilizando a extração da glândula. O material coletado apresentará sempre uma quantidade muito maior de impurezas, tais como hidrocarbonetos, ácidos graxos e outros, visto que tecidos de todo o inseto estão sendo extraídos, inclusive gorduras e cutículas.

ii) Extrato da glândula produtora: Este método torna-se extremamente vantajoso quando se sabe em qual parte do inseto está localizada a glândula produtora de feromônio, pois desta forma a extração pode ser feita nessa região específica, diminuindo consideravelmente as impurezas e, conseqüentemente, facilitando as futuras análises.

Em ambos os casos, o procedimento típico é a imersão dos insetos/partes do corpo/glândula em solvente e mantidos por 5 minutos, podendo ser realizada uma filtração com sulfato de sódio (Na_2SO_4) e subsequente concentração (Zarbin *et al*; 2001).

3.9.2. Concentração dos extratos

A remoção do solvente é uma das partes mais críticas deste processo. A volatilidade dos compostos, associada às pequenas quantidades, faz com que as perdas de material sejam frequentes, diminuindo o rendimento da extração. Para que tais perdas sejam minimizadas, após a obtenção dos extratos, estes devem ser armazenados em pequenos tubos cônicos, que irão facilitar a

evaporação. Um leve fluxo de nitrogênio ou argônio deverá ser suavemente passado sobre a superfície do solvente, até que seja atingida a concentração desejada (Zarbin *et al*; 1999).

A concentração ideal irá depender de cada caso em particular e envolve fatores como a quantidade de feromônio produzida pelo inseto. No entanto, em um primeiro estágio, as amostras podem ser concentradas para “insetos-equivalentes” (IE), ou seja, supondo-se que a coleta de feromônio foi realizada com 10 insetos (independente do método utilizado), os extratos seriam concentrados para 10 μ L.

Desta maneira, ao se injetar 1 μ L no cromatógrafo, a princípio, estariam sendo analisados todos os compostos, com suas respectivas proporções, para um único indivíduo. A partir deste dado inicial, as devidas correções de concentração podem ser feitas, caso seja necessário (Zarbin *et al*; 2001).

3.9.3. Cromatografia gasosa acoplada a detector eletroantenográfico (CG-EAG)

A principal característica dos insetos, no que diz respeito à comunicação química, é a sensibilidade e especificidade com que suas antenas atuam para a percepção do(s) correto (s) componentes (s) de seus feromônios. Estudando o comportamento eletrofisiológico no sistema olfativo de *Bombyx mori*, (Ferreira & Correia; 2001) revelou que o potencial de recepção do inseto ao seu feromônio poderia ser registrado utilizando-se uma antena isolada, posicionada entre dois microeletrodos capilares, que estariam conectados a um amplificador e a um registrador. O sistema, então chamado EAG (Detector Eletroantenográfico), em que a antena do inseto é utilizada como elemento sensível (detector biológico), passou a ser amplamente utilizado para realização dos ensaios biológicos.

Quando o EAG é utilizado isoladamente, sem um método de separação, como por exemplo a cromatografia gasosa (CG), não apresenta grandes vantagens pois não é possível especificar quais os componentes estão afetando o comportamento biológico do inseto e além disso pode-se não detectar um possível componente minoritário do feromônio.

A técnica da cromatografia gasosa acoplada ao detector eletroantenográfico (CG-EAG) foi primeiramente relatada por Moorhouse *et al.*,

(1969) *apud* Ferreira & Correia; (2001) como sendo um método extremamente eficaz para a detecção de feromônios, uma vez que estaria aliada a especificidade e sensibilidade do EAG a enorme capacidade analítica e separação do cromatógrafo. Utilizando-se esta nova tecnologia, por meio de uma simples análise do extrato bruto, pode-se determinar com total precisão, qual composto é o feromônio. O esquema de um cromatógrafo a gás acoplado a um detector eletroantenográfico (6A) (CG-EAG) e um dado cromatograma (6B), estão descritos na figuras 6A e 6B, respectivamente.

A amostra ao ser injetada, irá percorrer toda a coluna para que haja a separação dos compostos. Ao final da corrida, o fluxo que está saindo da coluna é dividido (split) em dois, sendo que uma parte vai para o DIC (Detector de ionização de Chamas) onde o cromatograma é registrado e a outra parte vai para o EAG, onde a resposta da antena é amplificada. Em função de ambas as detecções serem simultâneas, é possível saber se o composto registrado pelo DIC é ou não ativo (Zarbin *et al*; 2001).

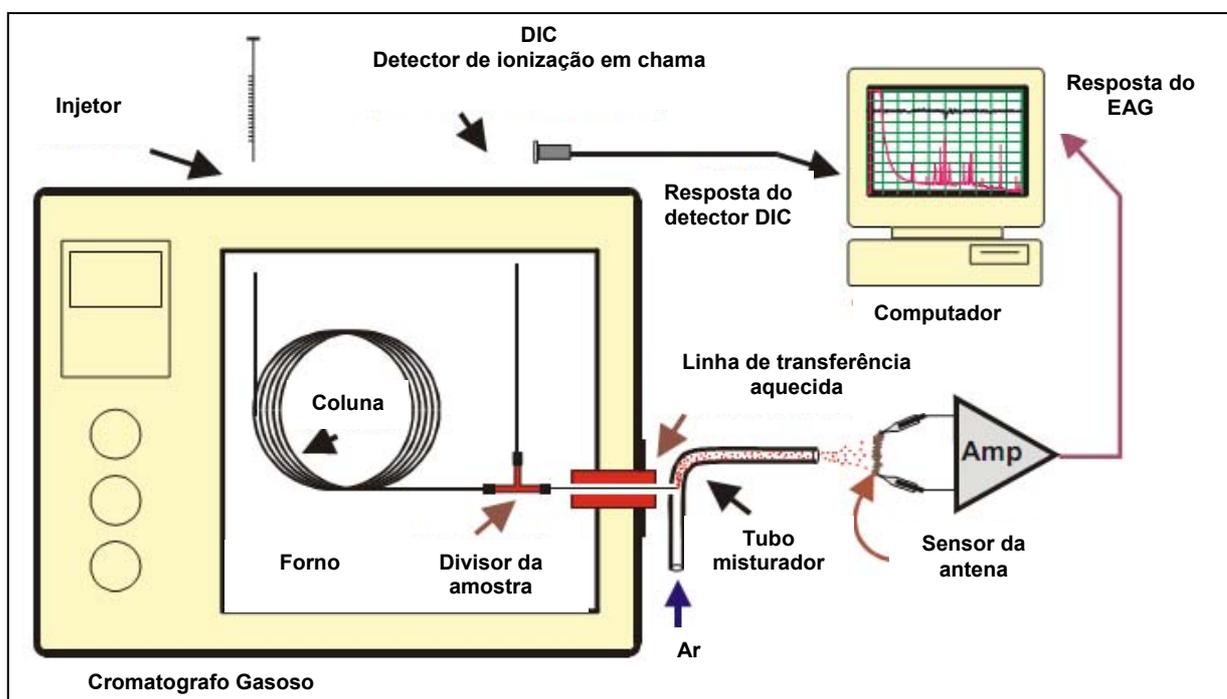


Figura 6A: Esquema de um CG-EAG (Adaptado de Syntech, 2004)

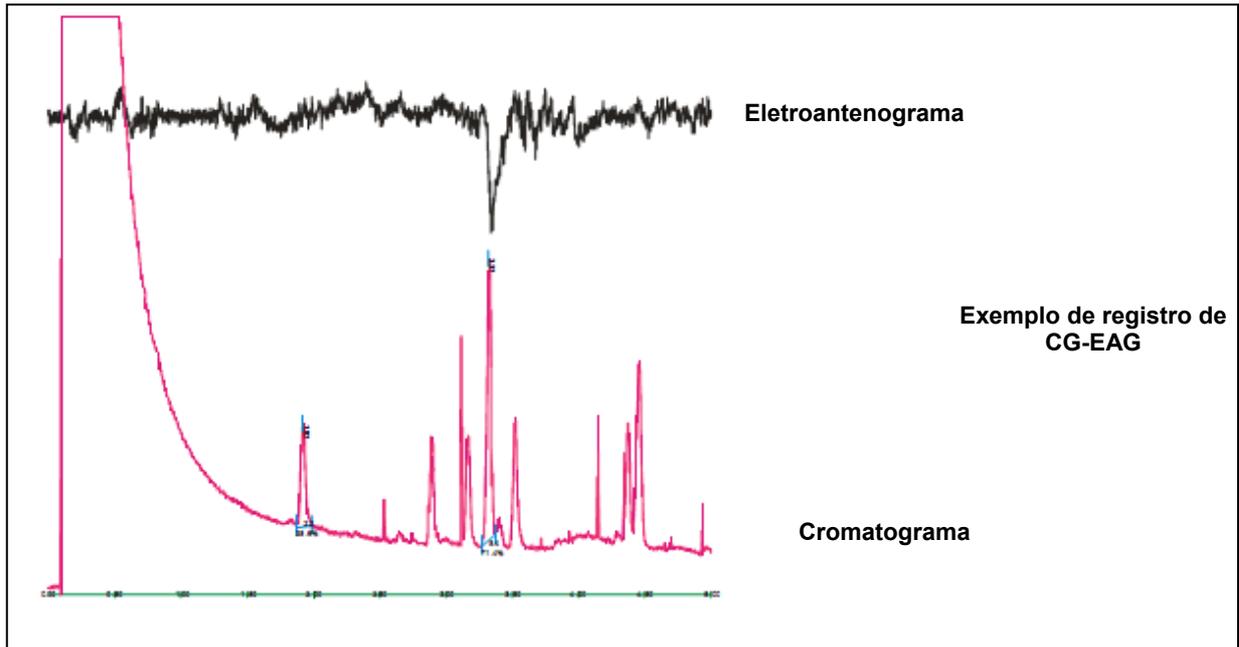


Figura 6B: Cromatograma obtido de uma análise por CG-EAG. (Fonte: Syntech, 2004)

O CG-EAG possui algumas características como:

- (i) Um simples amplificador de alta impedância e um filtro eletrônico que permite que as respostas da antena sejam gravadas em um registrador de gráficos padrão do CG;
- (ii) Eletrodos que não requerem um micromanipulador para a preparação da antena;
- (iii) Um detector de antenas que possui extrema sensibilidade e seletividade para detecção e confirmação dos componentes do feromônio.

Os microeletrodos são confeccionados de fios de prata de 1,2mm de diâmetro, com as pontas achatadas em forma de colher e eletroliticamente cloradas com solução de NaCl a 1%. Um ou dois segmentos da antena devem ser removidos para permitir contato elétrico (Parra, 2006).

Um método para se preparar a antena consiste na utilização do gel condutor de eletricidade. O gel pode ser utilizado em micropipetas, em substituição à solução salina ou pode ser aplicado na superfície do metal do eletrodo, onde a base e a ponta da antena são fixadas. Diferentemente da solução salina que repele as antenas hidrofóbicas, o gel estabelece um contato

com a antena. A base e a ponta da antena podem ser simplesmente colocadas no inteiro da gota de gel aplicada sobre a superfície do eletrodo (Parra, 2006).

O tubo de vidro que transfere o eluente do CG e o amplificador são apoiados na estrutura do CG, na localização mais conveniente e o eluente do CG entra no referido tubo à cerca de 10 a 15cm da antena preparada (figura 7).

A temperatura da água que forra a parede do tubo e a temperatura do umidificador do ar são controladas entre 18 e 26°C por meio de um circulador de água. O ar é umidificado ao passar por uma garrafa contendo água. Este ar umidificado esfria o fluxo do CG e evita o ressecamento da antena (Parra, 2006).

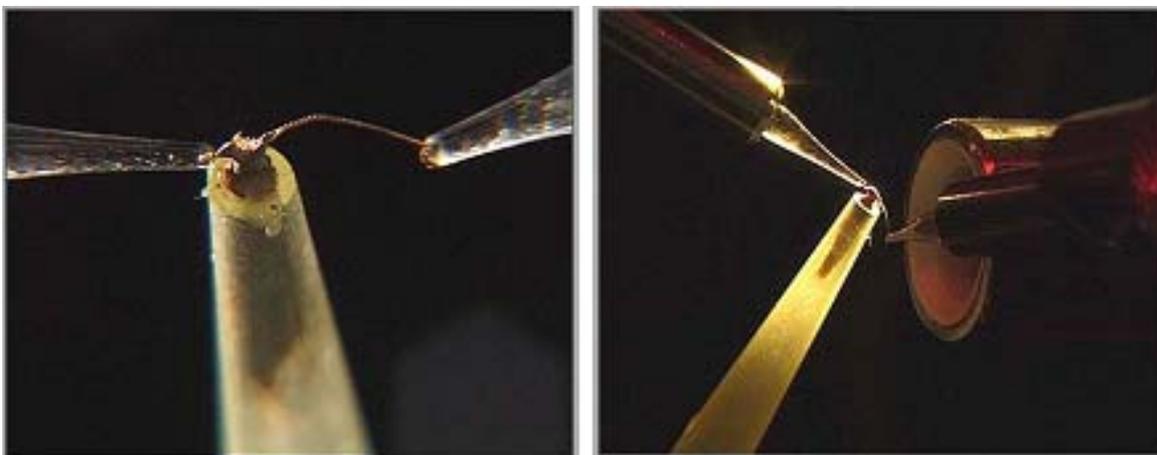


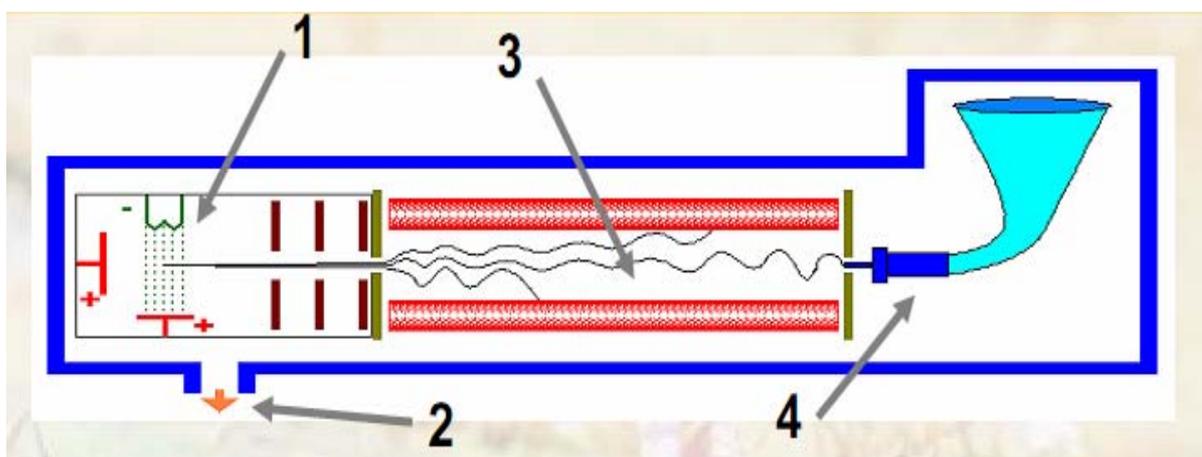
Figura 7: Preparação da antena para EAG.

3.9.4. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

A etapa de elucidação estrutural começa após se conhecer qual o composto a ser estudado. Desta forma, o primeiro espectro a ser realizado normalmente é o espectro de massas. Apenas uma pequena quantidade de material é requerida para a análise, sendo que as informações obtidas são fundamentais para a determinação estrutural da molécula. O fato de o equipamento utilizado estar acoplado a um cromatógrafo a gás (CG-EM) faz com que os espectros adquiridos sejam referentes a compostos quimicamente puros (Zarbin *et al*; 1999).

Para identificação de feromônios, os métodos comumente empregados para ionizar e fragmentar os compostos são os de ionização química (IQ) e de impacto eletrônico (IE) (esquema 1).

Na câmara de Ionização os elétrons gerados por um filamento aquecido bombardeiam a amostra. Os fragmentos ionizados (carga +1) são repelidos pelo eletrodo positivo e conduzidos ao separador magnético. Na saída, todo o interior do EM deve estar sob alto vácuo (natm). O separador Magnético deixa apenas os íons positivos atravessarem esta área do equipamento. E, um detector que possui uma válvula fotomultiplicadora ou um fotodiodo gera um sinal elétrico proporcional ao número de íons que incide sobre o elemento. (esquema 1) (Zarbin *et al*; 2001)



Esquema 1: Esquema de um Espectrômetro de massa (EM): 1: Câmara de Ionização; 2: Saída de Vácuo; 3: Separador Magnético; 4: Detector

Essa combinação de técnicas se mostra extremamente eficiente uma vez que para um determinado espectro o pico molecular não for registrado, ou for de baixa intensidade quando obtido por meio de Impacto Eletrônico (IE), a ionização Química (IQ) é empregada para a determinação do peso molecular correto do composto, ao passo que a IE, fornece muito mais informações a respeito da estrutura, por apresentar um número maior de fragmentações.

Na identificação do feromônio sexual de *Hesperophylax occidentalis*, em que ambas as técnicas de fragmentação foram utilizadas, os dados obtidos por CG-EM (por impacto eletrônico-IE) do composto, indicaram uma massa relativa aparente de 156 e, através das análises dos fragmentos e comparação destes

com padrões, sugeriu-se a estrutura de uma alcan-3-ona. O pico base m/z 174, obtido por Ionização Química (IQ) utilizando amônia (NH_3), confirmou a massa molecular 156 para o composto em questão (Bjostad *et al*; 1996), (Figura 8).

O tempo de retenção observado para o feromônio se mostrou inferior ao da decan-3-ona e superior ao da nonan-3-ona, utilizadas como padrões sintéticos. Isso sugeria o composto como sendo a nonan-3-ona, porém com uma ramificação metílica.

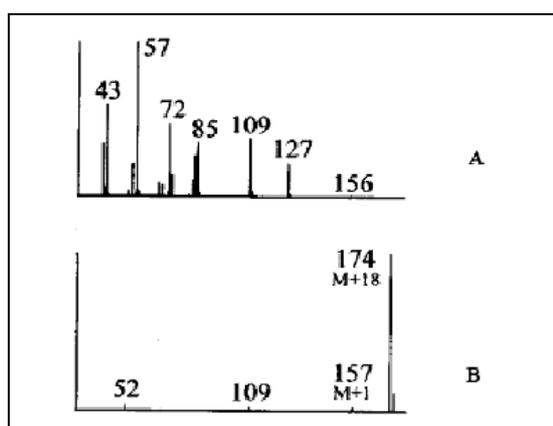


Figura 8: (A) Espectro de massa – Impacto eletrônico-IE-; (B) espectro de massa – Ionização Química-IQ- do feromônio sexual de *H. occidentalis* (extraído de Zarbin, 2001).

No intuito de determinar qual seria a posição trissubstituída na molécula, o esqueleto (hidrocarboneto) da estrutura foi preparado, a partir de derivatizações químicas realizadas no produto natural (descritos no item: Micro-derivatizações), visto que os espectros de massas de todos os monometil nonanos estão descritos na literatura (Stenhagen *et al*; 1974) e diferem significativamente entre si.

Através de comparações, atribuiu-se o hidrocarboneto obtido, como sendo o 4-metil nonano, o que indicava, mediante os dados anteriores, duas possibilidades estruturais para o feromônio; a 4-metil-nonan-3-ona ou a 6-metil-nonan-3-ona.

Para se atribuir em definitivo a estrutura química da molécula, uma análise minuciosa do espectro de massas se fez necessário. A presença dos fragmentos m/z 72 e m/z 84 indicavam, indubitavelmente, que tal composto era a 6-metil-nonan-3-ona.

As mesmas fragmentações, quando realizadas com a 4-metil-nonan-3-ona, deveriam apresentar fragmentos m/z 70 e m/z 86 os quais não estão presentes no espectro do produto natural.

3.9.5. Cromatografia gasosa bidimensional (CG x CG) acoplada a espectrometria de massas (EM) com detector “time-of-flight” (TOF)

A análise por CG-EAG concentra a identificação apenas sobre os componentes que têm atividade biológica. Muitas vezes, porém, CG-EAG indica atividade em áreas do cromatograma onde FID ou EM não detecta nenhum produto químico (Batista, *et al*; 2002). Nesses casos, o composto desconhecido tem de ser identificado por outros métodos, por exemplo, por profundas investigações eletrofisiológicas da antena do macho que restringe a escolha para algumas das estruturas que devem ser sintetizadas e testadas (Kalinová *et al*; 2003).

Outro problema no processo de identificação do feromônio surge com a co-eluição de vários compostos. As repetidas análises por CG-EAG em outra coluna com polaridade diferente, que resolve o problema, exige mais tempo e material adicional (Kalinová *et al*; 2006).

A CG × CG /TOF-EM é uma técnica analítica, recentemente desenvolvida, que oferece uma solução para o problema da co-eluição e que fornece uma alta sensibilidade e seletividade. Em princípio, o método consiste de dois sistemas de CG (CG × CG) (figura 9) equipado com colunas de polaridades diferentes, conectados por uma interface com uma câmara criogênica integrada. A câmara criogênica condensa repetidamente compostos eluídos da coluna principal e libera todo o efluente de primeira dimensão periodicamente como pulsos curtos para a coluna secundária. Esta coluna é operada em condições de alta velocidade. Parâmetros como a duração e a frequência de ambos, pulsos de condensação e injeção são variáveis e necessitam da afinação precisa do instrumento de acordo com os requisitos da análise (Dimandja, 2004).

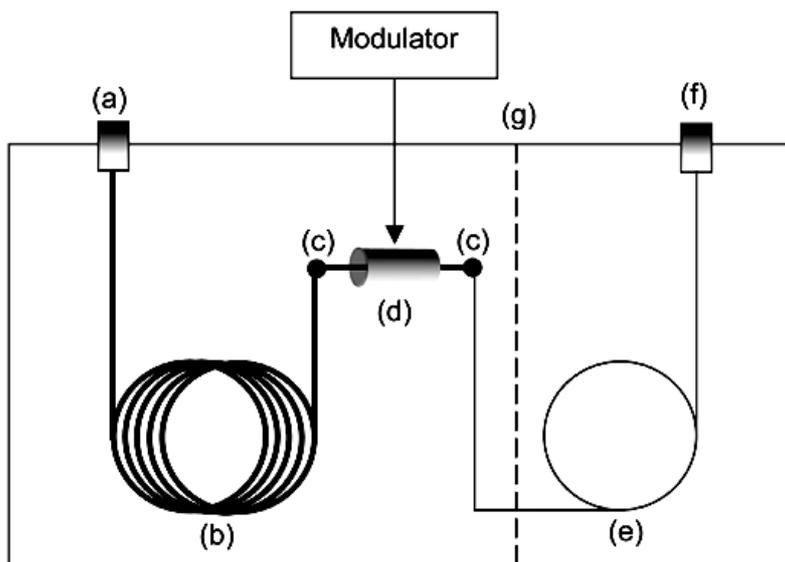


Figura 9: Diagrama básico de um sistema CG x CG onde: (a) injetor, (b) coluna primária, (c) conectores de coluna, d) interface CG×CG, (e) coluna secundária, (f) detector e (g) divisão opcional para um forno secundário (extraído de Dmandja, 2004).

A interpretação dos dados gerados pelo CG x CG é feita da seguinte forma (figura 10): (A) O cromatograma CG × CG é constituído por uma série de curtos cromatogramas de segunda dimensão. t_1 , t_2 e t_3 indicam o número de vezes em que ocorreram injeções para a coluna de segunda dimensão. O computador usa este número de vezes de injeção para cortar o sinal original em uma multiplicidade de diferentes cromatogramas (B). Estes são, então, alinhados com um plano bi-dimensional com retenção primária e secundária e com os eixos X e Y, a intensidade do sinal é o eixo-Z (C). Quando visto de cima, os picos possuem a aparência de anéis(D) (Phillips & Beens, 1999).

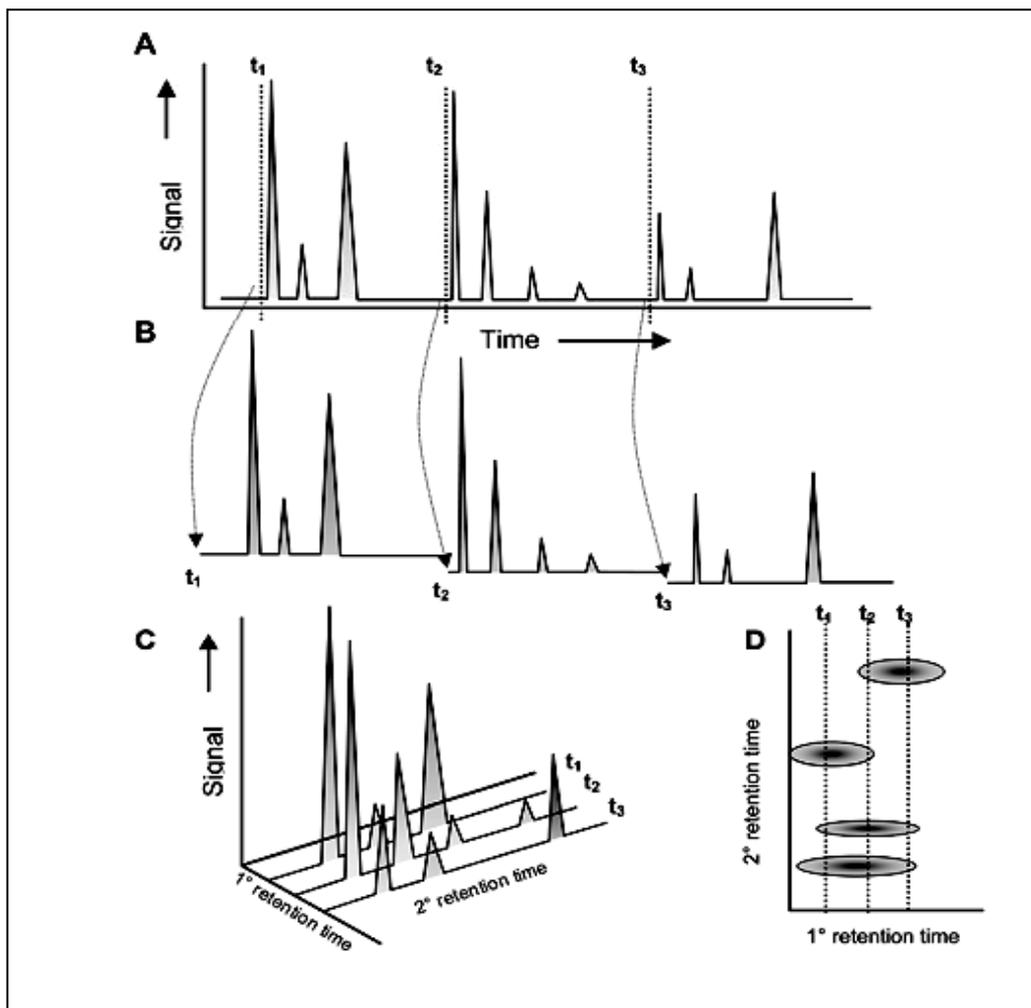


Figura 10: Esquema de picos de um cromatograma CG x CG (extraído de Dmandja, 2004)

A cromatografia bidimensional (CG × CG) produz picos muito estreitos (abaixo de 50 ms dependendo da frequência da modulação criogênica) deste modo, um detector TOF com uma elevada capacidade de aquisição de dados (até 500 espectros por segundo) é imprescindível. A natureza pulsante da fonte de ionização do TOF-EM reforça ainda mais o sistema de precisão, evitando o desvio espectral comum em um modo contínuo de ionização. Assim, o CG x CG com detecção TOF-EM funciona com uma elevada precisão independente do intervalo de concentração (Kalinová *et al*; 2006).

O desenvolvimento da CG× CG-TOF-EM está profundamente ligada com a evolução rápida da técnica de computadores e rápido processamento de sinais eletrônicos. Esta é uma razão, pela qual os instrumentos disponíveis comercialmente apareceram apenas há alguns anos atrás.

3.9.6. Reações de micro-derivatizações

As micro-derivatizações são realizadas no produto natural, quando o conjunto de dados espectroscópicos obtido não foi suficiente para se atribuir corretamente a estrutura molecular do feromônio, mas sugere que isto seja possível através da análise dos produtos de degradação da molécula.

Vários tipos de reações são possíveis de realizar-se tomando alguns cuidados uma vez que se utilizam pequenas quantidades de material. Os maiores problemas enfrentados estão normalmente relacionados às perdas de material ao término da reação (Beroza & Sarmiento, 1966).

A necessidade constante em se determinar o número correto de duplas ligações e a posição em que estas se encontram na molécula, principalmente para feromônios de lepidópteros, fez com que várias adaptações experimentais fossem realizadas através de métodos já conhecido em escala pequena, sendo que os mais comuns são hidrogenação catalítica (Beroza & Bierl, 1966), epoxidação (Schwartz & Blumberg, 1964), microozonólise (Beroza & Sarmiento, 1966) e derivatização com disulfeto de dimetila (DMDS) (Wall *et al*; 1990).

As derivatizações realizadas na identificação do feromônio de *H. occidentalis* (item 3.9.4-CG-EM) são pouco comuns em se tratando de química de feromônios, visto que há três etapas lineares envolvendo procedimentos relativamente complexos de serem realizados em pequena escala (nanogramas) (Bjostad *et al*; 1996). Em função disso, tais etapas serão discutidas em maiores detalhes.

Nas condições em que as análises de CG-EM foram realizadas, o feromônio apresentou um tempo de retenção de 7,05 min e uma massa molecular de 156. Após purificação e isolamento, este foi tratado com Hidreto de lítio alumínio (LiAlH_4) em éter, e o produto da reação apresentou um tempo de retenção ligeiramente superior (7,20 min) e uma massa de 158. Isso confirmava que o feromônio era uma cetona, e as análises do espectro de massa (EI) do produto de derivatização, sugeriam a possibilidade deste ser um alcan-3-ol. O álcool obtido foi tratado com dibromo trifenilfosfina, produzindo um composto com tempo de retenção superior (8,49 min), e espectro de massa coerente com o de um monometil bromononano.

O hidrocarboneto derivado do feromônio foi preparado, a partir da reação do brometo acima mencionado com borohidreto de sódio em DMSO (Figura 11). O tempo de retenção observado para o produto final foi de 4,22 min e o espectro de massa (EI) obtido, indicava ser este um 4-metil nonano.

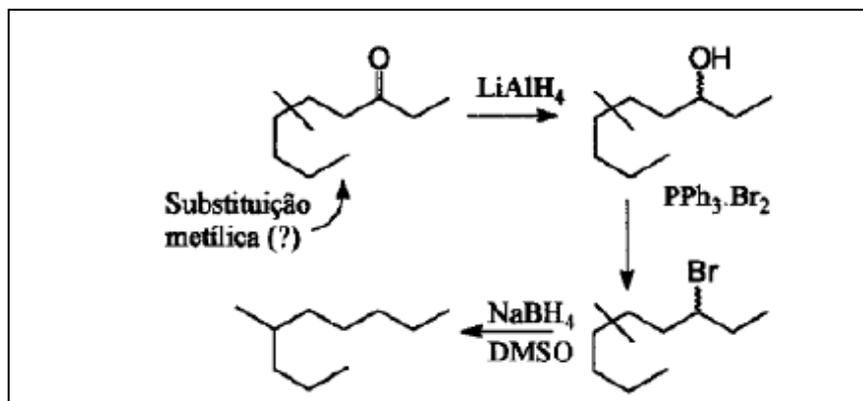


Figura 11: Seqüência de derivatizações realizadas para a preparação do hidrocarboneto correspondente ao feromônio de *H. occidentalis* (Extraído de Zarbin, 2001)

3.10. Uso dos feromônios

Os insetos são considerados nossos maiores competidores no que diz respeito à alimentação. Nesta disputa o homem tem recorrido, principalmente, ao uso de agrotóxicos. Porém o alto custo de inseticidas, riscos de intoxicação durante a aplicação, a possibilidade de ocorrência de partículas residuais no alimento desfavorecem o uso dessa prática de controle. Não obstante a estes fatores, o uso indiscriminado de agrotóxicos gerou uma série de complicações do ponto de vista biológico e ambiental, ou seja:

- Seleção de populações resistentes;
- Ressurgimento da praga em níveis mais altos;
- Surgimento de pragas secundárias (dizimação de inimigos naturais);
- Contaminação ambiental (incorporação na cadeia alimentar).

A solução para o controle de insetos-praga está vinculada ao uso de vários métodos compatíveis e racionais sem riscos a plantação e ao lucro do agricultor. Ao conjunto destes métodos dá-se o nome de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Vilela *et al*, 2001). Dentro deste manejo destaca-se o controle comportamental. Este tipo de controle é feito geralmente através do uso de feromônios, os quais são colocados em septos dentro de armadilhas de campo e podem atuar:

i) No monitoramento populacional: Consiste no acompanhamento sistemático da população da praga. Um programa de monitoramento pode refletir as mudanças na densidade populacional e a provável época de emergência de insetos adultos, podendo assim, estimar o local e época em que a atividade dos insetos será máxima, o que é fundamental para táticas de manejo. Como as armadilhas capturam insetos mesmo em baixas densidades populacionais, servem também para prever a incidência de uma dada praga na área de interesse. São úteis para definição das áreas de infestação e na detecção de pragas introduzidas, visando evitar sua dispersão (Wall *et al*, 1990).

Após o recrutamento, o inseto deverá ser aprisionado, fator que merece bastante atenção. Geralmente são utilizados materiais adesivos, água, armadilhas sem saída, com ou sem inseticidas. O monitoramento dessa forma fornecerá subsídios para avaliar a presença do inseto no campo, os níveis de dano e, conseqüentemente a tomada de decisão do agricultor. Na figura 12 está esquematizada uma armadilha tipo delta® atualmente utilizada para a captura da maioria dos lepidópteros, como por exemplo o bicho furão do citros (*Ecdytolopha aurantiana*) (Bento *et al*, 2001b).



Figura 12: Armadilha do tipo delta ® utilizada para *E. aurantiana* (extraído de Bento, 2001).

ii) Na coleta massal: Consiste na captura de insetos por meio de um sistema de armadilhas, contendo feromônios, capaz de remover um número significativo de indivíduos, reduzindo a população a níveis economicamente aceitáveis. Para isto, influenciarão as características da espécie a ser controlada. Algumas considerações fundamentais devem ser avaliadas para eficiência de programas de coleta massal (Lanier *et al*, 1990).

- Fonte de feromônio tão potente quanto a fêmea virgem
- Conhecimento sobre o hábito de acasalamento e estrutura da população
- Conhecimento das curvas de longevidade e mortalidade da espécie
- Padrão de liberação do feromônio pelas fêmeas
- Padrão de resposta dos machos
- Sinais visuais ou outros sinais

Como exemplo de coleta massal pode ser citada a identificação e a síntese do feromônio sexual da fêmea de *Migdolus fryanus*, a qual foi um grande avanço nos estudos com essa praga. O principal componente químico do feromônio sexual de *M. fryanus* é uma amida, a N-(2'S)-metilbutanoil-2-metilbutilamina. 1 mg desse feromônio, quando usado em condições de campo, é capaz de capturar 2,7 vezes mais machos que duas fêmeas virgens juntas. A formulação é em peletes ou pastilhas que são insolúveis em água; além de resistirem à radiação solar, podem permanecer por vários dias em condições de campo em dias chuvosos (Bento *et al*; 2001a).

iii) No confundimento: Consiste na impregnação da área com feromônios sintéticos, visando o rompimento do sistema normal de comunicação entre os indivíduos, reduzindo a probabilidade de encontros e/ou agregação dos sexos e, conseqüentemente, de acasalamentos (figura 13) (Agosta, 1990).

Uma vez que os feromônios têm natureza multicomponente, o confundimento pode ser feito alterando-se a concentração de apenas um componente da mistura feromonal. Neste caso, estariam envolvidos os mecanismos da habituação e o obscurecimento do feromônio natural. A ruptura da comunicação tem sido investigada por meio de feromônios sintéticos, mas o confundimento pode ser efetuado utilizando-se paraferomônios ou antiferomônios (Bento *et al*; 2001b).

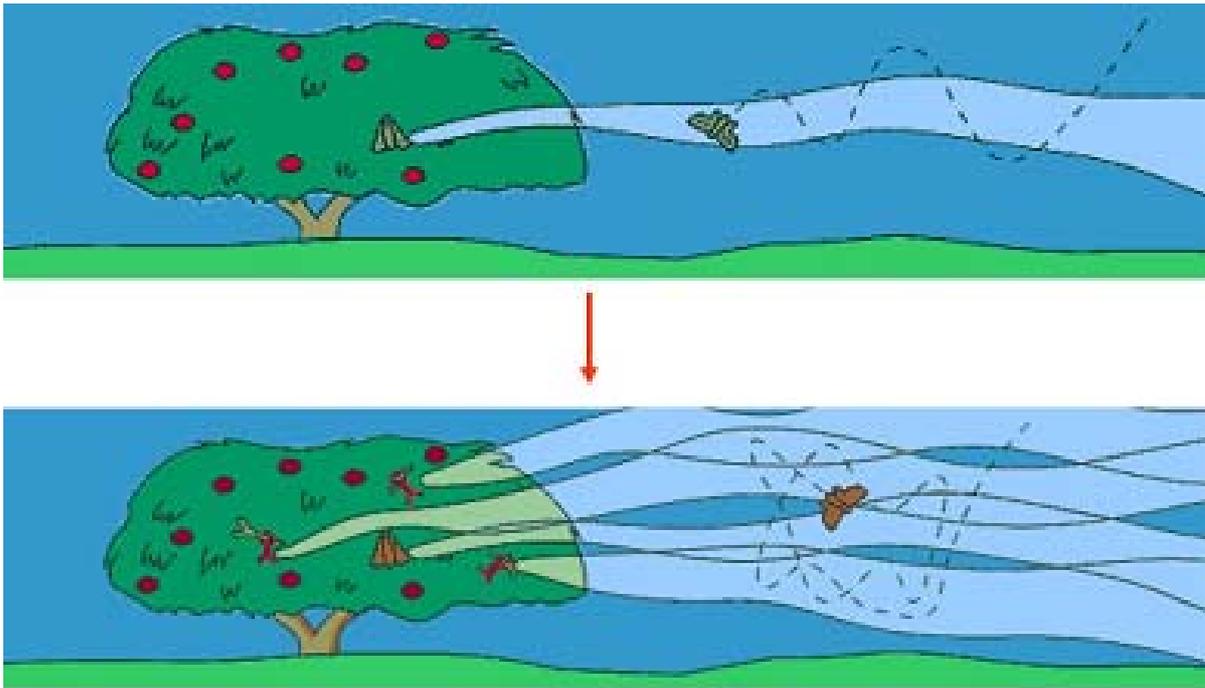


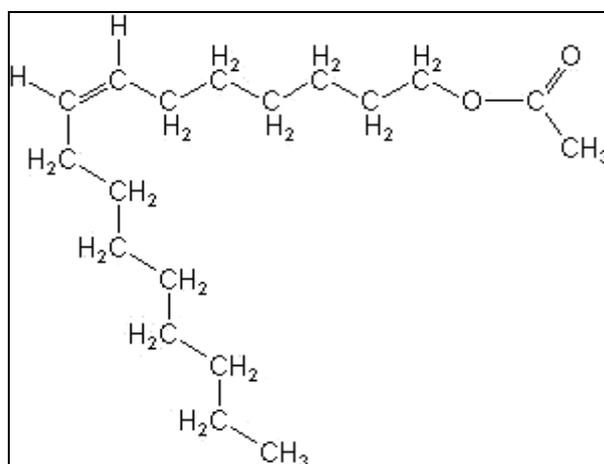
Figura 13: Técnica do confundimento

Paraferomônios são compostos químicos diferentes dos feromônios, mas provocam um comportamento idêntico ao do feromônio natural. Muitas vezes, os paraferomônios são semelhantes em estrutura química aos feromônios naturais, pois estimulam os receptores do feromônio natural, embora com menor eficiência que o próprio feromônio (Bento *et al*; 2001b).

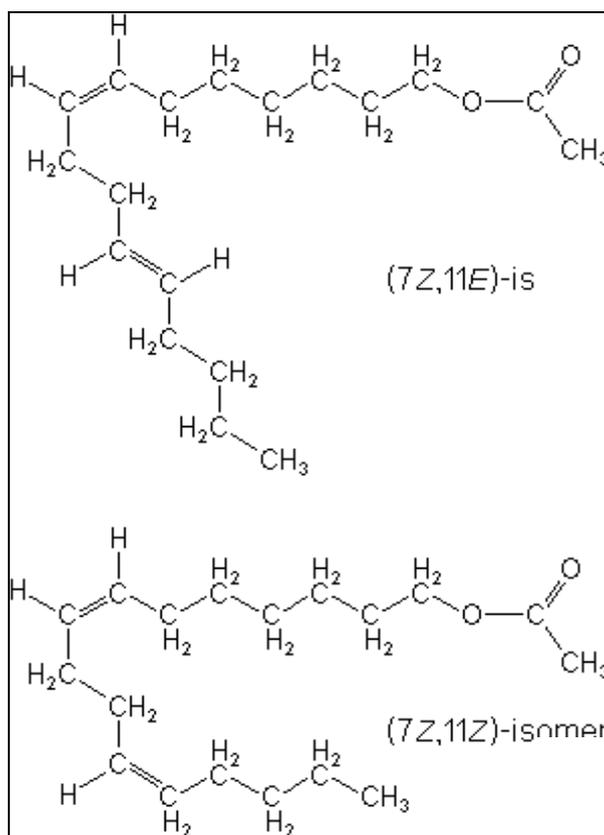
Esses compostos vêm sendo utilizados para interromper o sistema de comunicação normal dos insetos, como no caso da lagarta rosada do algodoeiro, *Pectinophora gossypiella* (Cardé & Minks, 1995). De acordo com os estudos realizados um paraferomônio desse inseto, o Hexalure (acetato de (7Z)-hexadecenila) [3] é cerca de 100 vezes menos estimulante aos machos que o Gossyplure (acetato de (7Z)-11-hexadecadienila) [4], o feromônio natural. Entretanto, 330g de Hexalure/ha volatilizando-se na atmosfera de algodoeiros, durante 16 semanas, provocaram confundimento da praga, com uma conseqüente redução de 75% no número de lagartas atacando as maçãs. Em alguns casos, estas substâncias não atraem os machos, mas interrompem a comunicação sexual.

Antiferomônios são substâncias químicas capazes de bloquear ou inibir diretamente a capacidade de resposta dos insetos aos seus feromônios naturais. Aparentemente, operam quando colocados próximos às fêmeas, daí

tornam-se difícil a sua utilização de maneira prática no confundimento de pragas (Bento, *et al*; 2001b).



[3] Hexalure



[4] Gossyplure

3.11. Perspectivas atuais do Manejo Integrado de Pragas através do uso de feromônios

Os feromônios são agentes altamente específicos, ou seja, seu espectro de ação é restrito e comumente atingem somente espécies alvo, eliminando o impacto ambiental causado por outros métodos de controle, tais como inseticidas, no qual outras espécies também são atingidas (Bento *et al*; 2001a).

Além disso, não provocam o aparecimento de resistência em insetos-pragas, favorecem a preservação de inimigos naturais e não são tóxicos para o homem e para o meio ambiente. Como desvantagem pode ser citada a especificidade, que restringe seu uso a uma única praga e a falta de conhecimento técnico por parte do produtor (Bento *et al*; 2001a).

O registro de feromônios ainda não é necessário para armadilhas de detecção e monitoramento, apenas se aplicado comercialmente. Embora alguns países classifiquem o uso de feromônios como controle biológico, outros os classificam como compostos químicos e exigem registro para os seus usos em coleta massal e confundimento, o mesmo que para inseticidas químicos.

No entanto, na maioria dos países, os requerimentos para registro de feromônio são mais leves do que aqueles requeridos para os inseticidas, particularmente quanto à toxicologia (Vilela *et al*; 2001).

A viabilidade do uso de feromônios no MIP depende do desenvolvimento multidisciplinar de diversas áreas afins, as quais devem participar através de seus conhecimentos próprios, de um esforço conjunto no desenvolvimento e aprimoramento da ecologia química em nosso país.

4. Material e Métodos

4.1. Material Biológico

A criação massal de *Diatraea flavipennella* foi mantida no laboratório de Ecologia Química (Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas). Para tanto, placas de vidro forradas com algodão, foram sobrepostas com papel de filtro cortado em círculo e, sobre estes tubos de PVC (10 cm de comprimento x 10 cm de diâmetro), forrados internamente com papel vegetal, cuja superfície serviu como substrato adequado para oviposição.

Os insetos foram alimentados com solução de sacarose (10%). Todo o aparato para a obtenção de massas de ovos de *D. flavipennella* foi mantido em sala climatizada ($21,5 \pm 0, 7^{\circ}\text{C}$). A folha de papel vegetal, contendo as massas de ovos de fêmeas, foi submetida ao processo de esterilização e posteriormente colocadas em tubos contendo dieta artificial fornecida pela Empresa de Assistência Fitossanitária e Controle Biológico-FITOSSAN/AL para alimentação das larvas recém-emergidas.

Cerca de 20 dias após a permanência das lagartas nesta dieta, as mesmas foram transferidas para placas de Petri contendo tabletes de dieta artificial, mantidas em condições de laboratório onde permaneceram até atingir a fase da pupa. A sexagem das pupas foi realizada de acordo com a descrição de Freitas *et al.*, 2007 (Figura 14) e mantidas dentro de gaiolas de vidro (14,8 cm x 30 cm x 30 cm), em sala climatizada, com fotoperíodo invertido de 12 horas de fotofase e 12 horas de escotofase. As pupas permaneceram na sala até a emergência dos adultos, os quais eram transferidos para câmara de acasalamento descrita anteriormente.

Uma vez por semana foi efetuada, na câmara de acasalamento, limpeza da placa de vidro, troca da manta de algodão e lavagem dos potes de PVC com água e sabão neutro (A figura 15).

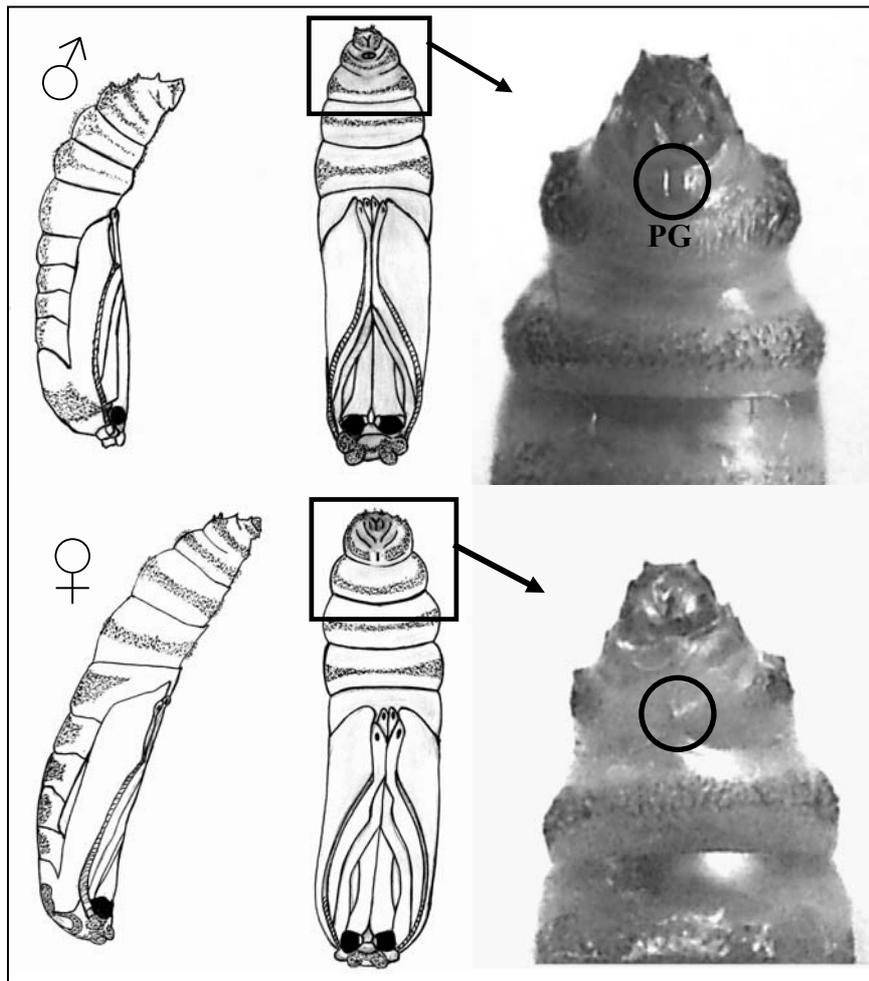


Figura 14: Diferença morfológica da genitália de machos e fêmeas de *D. flavipennella* destacando o **Poro Genital (PG)** encontrado em machos e ausente nas fêmeas desta espécie (Extraído de Freitas *et al.*, 2007).

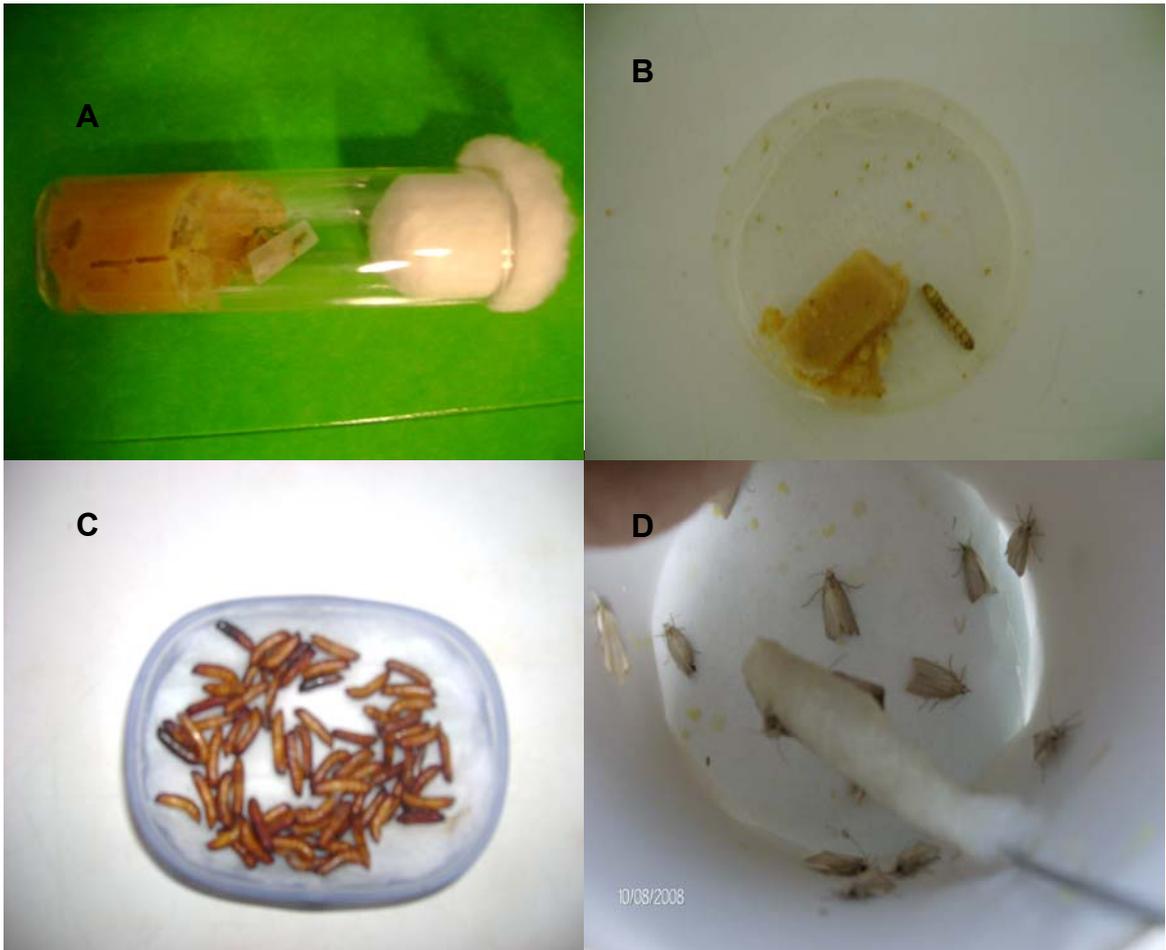


Figura 15: Etapas da criação de *D. flavipennella*: (A): ovos e lagartas de 1º instar; (B) lagartas

acima do 3º instar; (C) pupas sobre algodão umedecido e (D) insetos adultos no interior da câmara de acasalamento (tubo de PVC), forrada com papel vegetal, suprida com algodão embebido em solução de sacarose a 10%.

4.2. Bioensaios para observações de comportamento reprodutivo

Os testes etológicos foram realizados em uma sala escura a qual foi mantida com fotoperíodo invertido a uma temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de $80\%\pm 10\%$. Foi oferecida uma intensidade de iluminação de $3,5\text{ W/m}^2$, durante as 12 horas de fotofase e uma lâmpada vermelha de 15W foi usada para facilitar as observações durante as 12h da escotofase.

Três diferentes tipos de bioensaios foram conduzidos, na presença de no mínimo dois observadores cada uma, a saber:

i) Estudo do padrão de chamamento, corte e acasalamento de adultos de *D. flavipennella*: Seis (6) grupos contendo cinco casais virgens de mesma idade foram colocados, no interior de uma câmara de vidro (14,8cm x 30cm x 30cm), denominada câmara de bioensaios, e observados por 20 minutos a cada hora da fotofase e escotofase (12:12) desde o primeiro até o último dia de vida do estágio adulto. Durante este período, os insetos foram alimentados através de um algodão embebido com solução de sacarose (10%) o qual era trocado a cada 2 dias.

Os registros destas observações consistiram na descrição das movimentações físicas do inseto e determinação do tempo de cópula ($n=30$), contado desde o início (união de genitálias) até o término (desacoplamento de genitálias).

ii) Estudo da periodicidade e idade do comportamento de chamamento exibido por fêmeas virgens de *D. flavipennella*: Seis (6) grupos contendo cinco (5) fêmeas virgens cada, foram acondicionados em câmaras de vidro (14,8cm x 30cm x 30cm). A periodicidade de chamamento foi observada por no mínimo dois observadores, em sistema de reversamento, durante 20 minutos, a cada hora, durante as 12 horas do período de fotofase e 12 horas da escotofase, a partir do primeiro até o último dia de vida do estágio

adulto da fêmea, as quais foram alimentadas com algodão embebido em solução de sacarose (10%) trocados a cada 2 dias.

As observações consistiram no registro da idade cronológica em dias (fator A) e a hora inicial e final em que cada fêmea exibiu o comportamento de chamamento (fator B). A obtenção dos dados relativos a cada hora foi obtida através da mediana dos três (3) registros realizados a cada 20 minutos e este experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) seguindo um esquema fatorial 8 x 12, os quais correspondem aos fatores (A)-idade em dias (8) e (B)-horas da escotofase (12), respectivamente, em um total de 96 dados coletados.

iii) Observação da frequência e proporção de acasalamento entre adultos de *D. flavipennella*: Seis (6) grupos de insetos compostos por fêmeas e machos nas seguintes proporções: 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 2:2 e 2:3, respectivamente, foram introduzidos, no interior da câmara de bioensaios. Estes grupos permaneceram na câmara até o último dia de vida da fêmea, sendo alimentados com solução de sacarose (10%).

A parte interna da câmara de acasalamento foi revestida com papel vegetal para que a fêmea efetuasse a deposição de ovos. Diariamente, o papel e machos mortos eram substituídos por novos da mesma idade. Após a morte da fêmea, a mesma foi dissecada na região abdominal e o número de espermátóforos contidos na sua *bursa copulatrix* contado com auxílio de microscópio estereoscópio (Wild Leica ®).

Deste modo, a frequência de acasalamento, por fêmea, e influência da razão sexual foram analisados. Este experimento foi repetido 15 vezes por grupo, exceto para o grupo com duas (2) fêmeas, no qual o experimento foi repetido 30 vezes.

4.3. Extração do feromônio sexual de *D. flavipennella*

Observou-se, no horário de chamamento, durante a escotofase (período determinado no estudo de comportamento reprodutivo), àquelas fêmeas que estavam exibindo uma estrutura localizada na porção final do abdômen ligada ao ovipositor e denominada glândula produtora de feromônio. As referidas fêmeas, em chamamento, foram colocadas em um freezer localizado no

Laboratório de Ecologia Química (IQB-UFAL), durante 5 minutos, o qual manteve as condições fisiológicas da glândula feromonal.

Posteriormente foram retiradas do freezer e, com auxílio de um bisturi, o sétimo e oitavo segmentos abdominais de cada fêmea foram cortados e lavados em hexano por 30 segundos. Em uma cuba foi realizada a lavagem dos ovipositores de fêmeas de *D. flavipennella* em 100 μ L de hexano.

Durante todo o processo de preparação dos extratos, a cuba foi mantida imersa em gelo a fim de evitar a evaporação do solvente. No momento das análises, os extratos foram concentrados cerca de 10 vezes a fim de produzir 1 μ L de extrato (Figura 16).

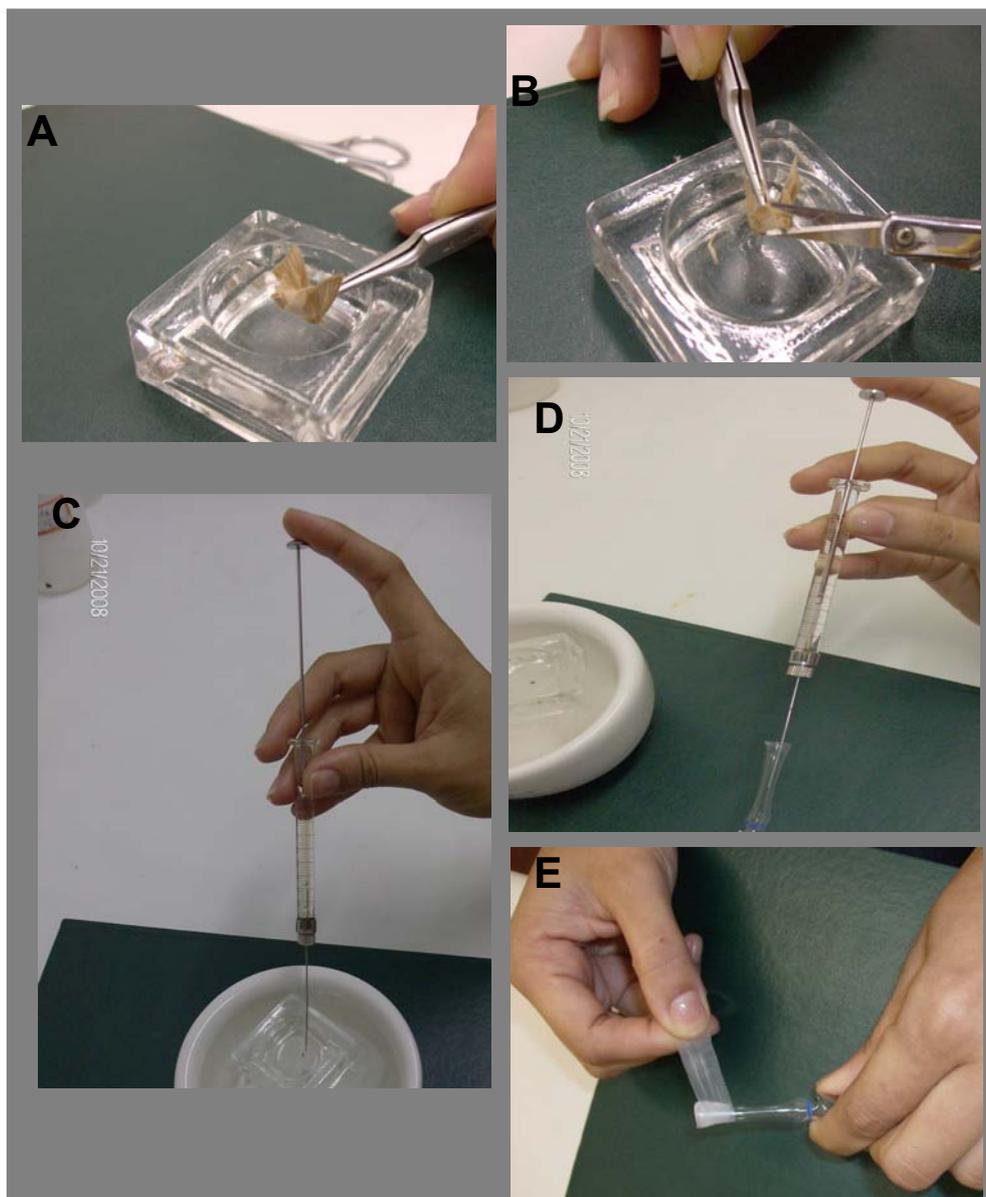


Figura 16: Etapas da extração da glândula feromonal. (A) fêmea de *D. flavipennella*, (B) Corte na região abdominal, (C) Adição de solvente, (D) transferência para ampola e (E) selagem

Os extratos foram armazenados em freezer a -10°C e posteriormente enviados para o Institute of Organic Chemistry and Biochemistry (**IOCHB**) da Academia Tcheca de Ciências, localizado em Praga, República Tcheca, para fins de identificação dos componentes do feromônio sexual.

4.4. Isolamento e identificação do feromônio sexual de *D. flavipennella*

Estas etapas do trabalho foram desenvolvidas no IOCHB-República Tcheca, em parceria com os Drs. Michal Hoskovec e Blanka Kalinová.

4.4.1. Cromatografia Gasosa acoplada a Eletroantenografia

As análises foram realizados em um Cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890 equipado com uma coluna DB-5 (J & W Scientific, Folsom, CA, USA e filme de 30 m x 250 μm) divididas por um Graphpack 3D / 2 com *split* de quatro-braços. Dois braços do *splitter* levam o eluato aos detectores DIC e EAG.

O gás auxiliar (make-up) nitrogênio (N_2) com fluxo de razão 20 mL / min foi introduzido através do quarto braço do *splitter* (para minimizar a condensação). Para as análises, 1-5 μL de extrato foram injetados sob o modo *splitless* (sem divisão de amostra).

O CG foi operado a uma temperatura inicial de 50°C durante 2 minutos e, em seguida, elevado, a uma taxa de $7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 270°C (com 10 min de intervalo). A temperatura do injetor e do detector foram fixadas em 200 e 260°C , respectivamente.

O efluente do EAG foi insuflado por meio de um tubo condicionador de efluentes (Syntech) para uma antena isolada do macho colocada sobre o orifício do tubo de vidro por meio de dois eletrodos Ag / AgCl. Uma sonda universal AC / DC (Syntech) foi usada para registrar e amplificar a resposta antenal.

Os sinais do DIC e EAG foram encaminhados para um PC através do pacote de interface serial IDAC (Syntech). A figuras 17 e 18 mostram o equipamento (CG-EAG) pertencente ao IOCB, no qual estas análises foram realizadas.



Figura 17: Cromatógrafo gasoso (IOCHB)



Figura 18: Detector Eletroentecnográfico (IOCHB) com ênfase para os eletrodos onde está inserida a antena do macho de *D. flavipennella*.

Os sinais foram analisados utilizando *GC-EAD software* (Syntech ®). Uma solução contendo uma série de n-alcanos (C₈-C₂₂, Sigma-Aldrich), foi co-injetada com amostra autêntica (extratos de fêmeas de *D. flavipennella*) para determinar o comportamento de retenção dos compostos EAG ativos, comparando-os ao índice de Kovats. Para o registro, foram utilizadas antenas de machos com pelo menos um a dois dias de idade e estes foram mantidos em baixas temperaturas (~ 5° C) e alta umidade até a sua utilização.

4.4.2. GC x GC-TOF-EM

As análises CG x CG -TOF-EM foram realizadas utilizando instrumento LECO Pegasus 4D (LECO Corp, St. Joseph, MI, U.S.A.) (figura 18), equipado com um criomodulador *quad-jet* não-móvel. Uma coluna levemente polar DB-5 (J & W Scientific, Folsom, CA, USA; e filme de 30m x 250µm i.d. x 0.25 µm) foi utilizada para GC na primeira dimensão.

A análise de segunda dimensão foi realizada em uma coluna polar BPX-50 (SGE Inc., Austin, TX, U.S.A.; e filme de 2 m x 100 µm). Hélio foi utilizado como um gás de arraste em um fluxo constante de 1 mL/min. O programa de temperatura para o primeiro forno CG foi o seguinte: 50°C por 2 min. seguindo de aquecimento de 50-300° com velocidade de 10°C/min, e finalmente, 10 minutos de intervalo até 300°C. O programa no forno secundário foi de 5°C mais alto do que no primário e foi operado em um modo isotérmico.

O período de modulação, duração de pulso quente, e o tempo de resfriamento entre os estágios foram fixados em 3.0, 0.4 e 1.1 s, respectivamente. A linha de transferência para a fonte do detector TOF foi

operada a 260°C. A fonte de temperatura foi de 250°C, com um filamento viés de -70 eV de tensão°. A taxa de aquisição de dados foi de 100 Hz (scans/s) para o intervalo de massa de 29-400 amu. A tensão do detector foi de 1750V.

Amostras (1 µL) foram injetadas no modo splitless por meio de um sistema automático de injeção (Agilent Technologies, injetor Série 7683). A temperatura de entrada foi de 200°C. O tempo de purga foi 60 s em um fluxo de 60 mL/min. Os dados foram processados e consecutivamente visualizados em cromatogramas sob duas e três dimensões (2D e 3D) usando o programa LECO ChromaTOF®.

Tal como nos experimentos em CG-EAG, séries de n-alcenos (C₈-C₂₂; Sigma-Aldrich), foram co-injetados com amostras autênticas para determinar o comportamento de retenção dos analitos em comparação o índice de Kovats. Análises semi-quantitativas, baseadas nas áreas de pico calculadas de compostos, foram utilizadas para determinar as proporções daqueles biologicamente ativos.



Figura 19: CG x CG (LECO Pegasus 4D)-TOF-EM

4.4.3. Compostos Químicos

Padrões sintéticos foram preparados no Instituto de Química Orgânica e Bioquímica da Academia Tcheca de Ciências, Praga, República Checa. Todos

os padrões foram purificados por cromatografia e dissolvidos em hexano (HPLC), antes de análises.

4.6. Determinação da posição da dupla ligação em moléculas de feromônio: Metiltioação

Para realizar a reação de derivatização, 50 µL de disulfeto de dimetila (DMDS) foram adicionados a 250 µL de um extrato hexânico de *D. flavipennella* (0.2 FE/µL), seguidos por 12,5 µL de uma solução de iodo em éter (60 µg/ µL) em um frasco reagente.

A mistura foi deixada em temperatura ambiente por 24 horas, sob agitação. Em seguida, 60 µL de hexano foram adicionados à mistura seguido de algumas gotas de uma solução a 5% de tiosulfato de sódio até que a mistura se tornou incolor. Uma alíquota de 1 µL do extrato hexânico foi submetida à análise por CG x CG-TOF-EM.

4.7. Bioensaios para verificar a eficiência da mistura feromonal

No laboratório de Ecologia Química, os bioensaios foram realizados em uma arena de vidro (14,8cm x 30cm x 20,3cm) com uma tampa perfurada, a qual foi colocada em uma sala escura, apresentando as seguintes condições: temperatura de $23,9 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e $64\% \pm 3,5\%$ de umidade relativa e fotoperíodo invertido de 12 horas de fotofase e 12 horas de escotofase. Durante a escotofase foi utilizada uma lâmpada vermelha de 15 Watts.

Os compostos sintéticos foram diluídos em hexano. Alíquotas contendo 10µL da solução foram aplicadas sobre o disco de papel de filtro (ϕ 20mm, Whatman®) com auxílio de microseringa. Após a evaporação do solvente, os discos foram pendurados em posição central e colocados na arena de vidro (acima citada) empregada como olfatômetro. Em seguida, cinco machos virgens (1-3 dias de idade) foram introduzidos, ao mesmo. O comportamento dos machos e o tempo necessário para chegar à fonte de feromônio foram registrados ininterruptamente durante 20 minutos.

A descrição dos tratamentos e repetições encontram-se no próximo item (4.8.) referente ao delineamento experimental destes bioensaios.

Uma vez que o pedido de propriedade intelectual da mistura que compõe o feromônio sexual de *D. flavipennella* está em fase de solicitação, os nomes dos compostos serão resguardados até a conclusão do processo. Um isômero destes compostos também foi testado nas análises comportamentais a fim de verificar a existência de influência na resposta obtida pelos machos. Assim, os nomes atribuídos ao mesmo foram DF1 (*D. flavipennella* 1), DF2 (*D. flavipennella* 2) e DFi (*D. flavipennella* isômero).

4.8. Delineamento experimental dos bioensaios com feromônios

Todos os experimentos foram realizados em um delineamento inteiramente casualizado. Para a avaliação das respostas comportamentais de machos virgens de *D. flavipennella* diante de fêmeas em chamamento, extratos hexânicos da glândula feromonal e mistura sintética contendo os componentes do feromônio sexual de fêmeas de *D. flavipennella*, em diferentes proporções, foram empregados.

Foram considerados os seguintes tratamentos: Tratamento 1: mistura de 75% DF1 + 5% DF2 + 20% DFi; tratamento 2: mistura de 80% DF1 + 10% DF2 + 10% DFi; tratamento 3: mistura de 50% DF1 + 20% DF2 + 30% DFi; tratamento 4: mistura de 75% DF1 + 25% DF2 tratamento 5: Extrato de glândulas produtoras de feromônio sexual (1FE) e tratamento controle: Fêmea virgem viva em chamamento. O tratamento 4 obedeceu a proporção determinada nas análises por CG x CG-TOF-EM.

Todos os experimentos foram realizados utilizando quatro repetições para cada tratamento e as seguintes variáveis, baseadas no comportamento de corte exibido por machos, foram consideradas : Agitação de Asas (AA), Pousos sobre o papel de filtro impregnado com o tratamento (PP), Pousos com abertura de cláspes (PAC) e tentativa de cópula sobre o papel filtro impregnado com o tratamento (TC).

4.9. Análises Estatísticas

Os dados obtidos para as observações relacionadas ao comportamento de chamamento (NFCC) foram previamente analisados para verificar se elas atendem os pressupostos de normalidade multivariada e homogeneidade dos resíduos das variâncias por meio dos testes de *Liliefors* e *Levene*,

respectivamente, considerando 5% de erro experimental. Em seguida, análise de variância utilizando o teste F ($p < 0,5$) foi realizada para verificar diferença significativa entre os fatores analisados e suas interações. A melhor maneira de apresentar os resultados observados foi a regressão linear múltipla da superfície de resposta considerando um erro experimental de 10% pelo teste de *Student* (t) para o coeficiente de regressão (β_i).

Os dados obtidos dos bioensaios de frequência de acasalamento foram tratados por um método não-paramétrico, teste de *Kruskal-Wallis* (U), devido à inexistência de distribuição normal dos resíduos (distribuição Gauss), para analisar o número de espermatozóides que foram encontrados na *bursa copulatrix* das fêmeas após o acasalamento. Para múltiplas comparações entre as razões sexuais, o teste estatístico utilizado foi o não paramétrico, chamado teste de *Nemenie* ($p < 0.05$).

5. Resultados

5.1. Comportamento de chamamento, corte e acasalamento de adultos de *D. flavipennella*

A seqüência comportamental de machos e fêmeas está descrita no esquema 2. O comportamento de chamamento foi iniciado pelas fêmeas na segunda hora da escotofase e prosseguiu até a décima segunda hora. Fêmeas em chamamento adotam uma posição estacionária, elevam as suas asas e abdômen, expondo, assim, a glândula produtora de feromônio, e presumivelmente liberando um feromônio que atraiu indivíduos do sexo oposto.

Foi observado que tal comportamento foi exibido continuamente. Nenhuma atividade foi observada durante a fotofase.

O comportamento de cômte exibido por machos de *D. flavipennella* também se inicia na segunda hora e termina na última hora da escotofase. Cinco etapas distintas deste comportamento foram observadas, a saber: vôo orientado, abertura de asas e cláspes, pouso no abdômen da fêmea, contato genital e cópula com subsequente giro de 180° (figura 20A). Em seguida, o macho permanece parado na parede da câmara de bioensaios.

A cópula dura em média $100,5 \text{ min} \pm 18,16 \text{ min}$ e, na maioria dos casos, ela foi interrompida pelo macho que se afasta e conseqüentemente desacopla-se da genitália da fêmea (figura 20B).

Após o acasalamento, as fêmeas de *D. flavipennella* não aceitam uma outra cópula. Em condições de laboratório, observou-se que, na ausência de plantas de cana-de-açúcar, as fêmeas acasaladas ovipositam na parede da câmara de acasalamento, e, na presença da mesma, a oviposição se dá na superfície das folhas.

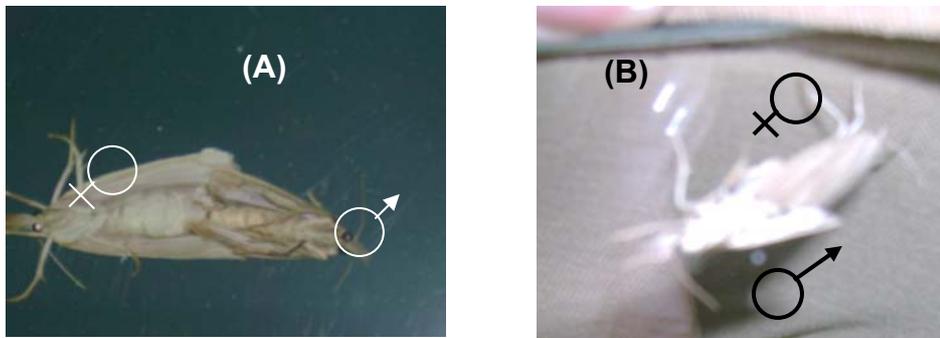
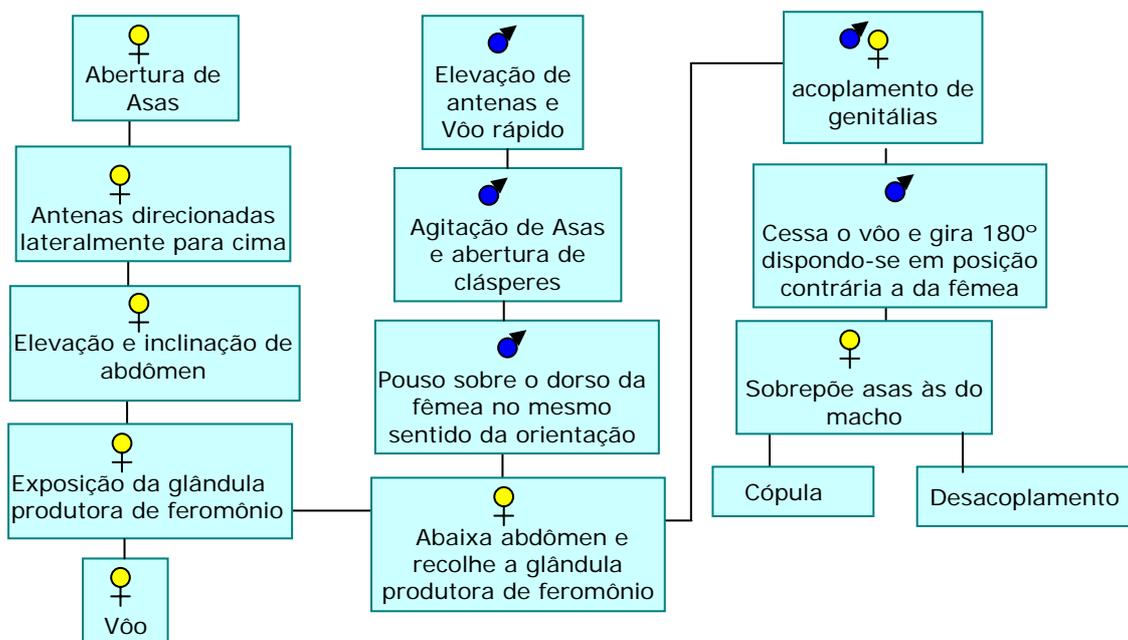


Figura 20: (A) Cópula; (B) Afastamento do macho ao término da cópula



Esquema 2: Seqüência do comportamento de corte de machos, chamamento de fêmeas e acasalamento.

5.2. Periodicidade de chamamento de fêmeas de *D. flavipennella*

Como pode ser visto na figura 21, para a variável desfecho NFCC (Número de Fêmeas exibindo Comportamento de Chamamento), o tempo foi um fator altamente significativo ($P < 0,01$), demonstrando que para cada hora da escotofase ($T = 1,1426$), houve um incremento quadrático da variável NFCC. Para a idade das fêmeas, também houve um incremento quadrático

altamente significativo ($P < 0,01$), que aumentou em 89% para cada dia de vida da fêmea. Apesar disto, uma redução significativa, representada por uma diminuição de 5,4% ($P < 0,01$) foi observada quando os fatores "tempo (hora de escotofase)" e "idade das fêmeas" foram associadas com NFCC, demonstrando que ocorre, a partir de determinado tempo e idade (T^2 , TI e I^2), um antagonismo entre os fatores analisados. Este modelo também apresentou um grau de adaptação (R^2) de 0,8275, que pode ser utilizado para explicar aproximadamente 82,75% da variação total observada no experimento.

$$\text{NFCC}_{\text{estimado}} = 2.6121 + 1.1426^{**} T + 0.8907^{**} I - 0.0569^{**} T^2 - 0.0544^{**} TI - 0.0951^{**} I^2 \quad R^2 = 0,8275$$

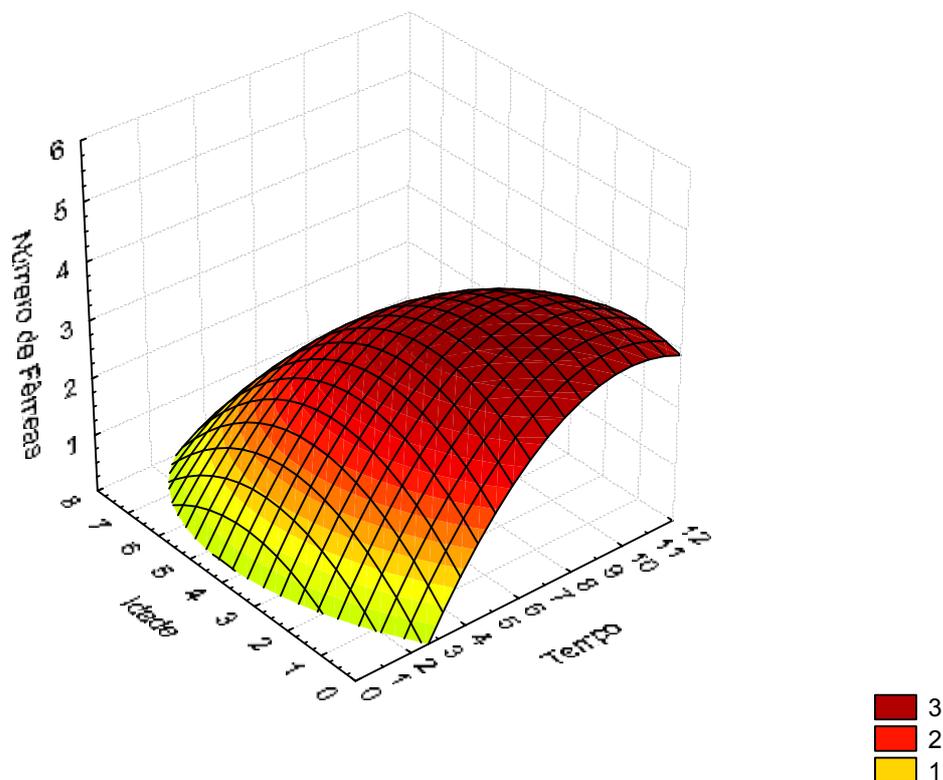


Figura 21: Superfície de resposta demonstrando o NFCC (número de fêmeas exibindo comportamento de chamamento). Na equação, os símbolos: * e ** indicam significância estatística pelo teste de Student ($p < 0.05$ e $P < 0.01$, respectivamente). Diferentes cores

representam diferentes intervalos de interação fatorial entre a hora da escotofase (T) e idade das fêmeas (I) para NFCC.

Assim, a partir das derivadas parciais de cada fator (I e T) estudado, observou-se que o maior número de fêmeas exibindo comportamento de chamamento foi de aproximadamente quatro, após nove horas do início da atividade de chamamento para fêmeas de dois dias de idade.

Um antagonismo foi observado e quantificado à medida que a idade das fêmeas aumentou em função dos dias, verificando-se uma diminuição da variável NFCC.

5.3. Frequência de acasalamento entre adultos de *D. flavipennella*

Independentemente da proporção sexual, observou-se que todas as fêmeas acasaladas tiveram apenas um espermatóforo na sua bursa copulatrix, demonstrando que fêmeas de *D. flavipennella* copulam apenas uma vez.

Considerando a proporção entre machos e fêmeas, observou-se uma diferença entre os grupos com base em um *ranking* adotado após os resultados das observações, as quais foram analisadas pelo teste U (Figura 22). De acordo com este teste, as melhores proporções de fêmeas para machos foram: 1:1, 1:3, 2:2 e 2:3, enquanto as proporções: 1:2 e 2:1 foram menos eficazes.

Portanto, para otimizar o comportamento de acasalamento, levando em consideração o nível populacional, a razão sexual 1:1 é recomendada, uma vez que oferece uma grande chance de sucesso da fêmea no acasalamento.

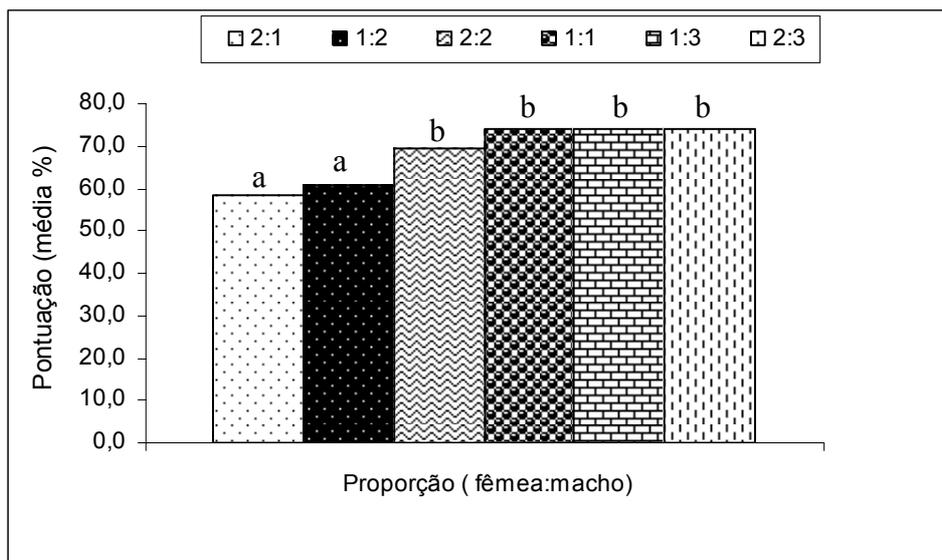


Figura 22: Freqüência de acasalamento utilizando diferentes razões sexuais de adultos de *D. flavipennella*. Escores médios seguidos de mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com os seguintes testes: Teste de Kruskal Wallis ($p < 0.05$) e teste de Nemenie ($p < 0.05$).

5.4. Análises por CG-EAG e CG x CG-TOF-EM

As análises por CG-EAG de extratos de glândulas de *D. flavipennella* (1-5 fêmeas equivalentes) mostraram uma proeminente área de atividade (figura 23). A análise detalhada revelou um pico majoritário (DF1) e um pico minoritário (DF2) de respostas no EAD, entre os picos, correspondentes aos padrões H1(Hidrocarboneto 1) e H2 (Hidrocarboneto 2) (figura 24).

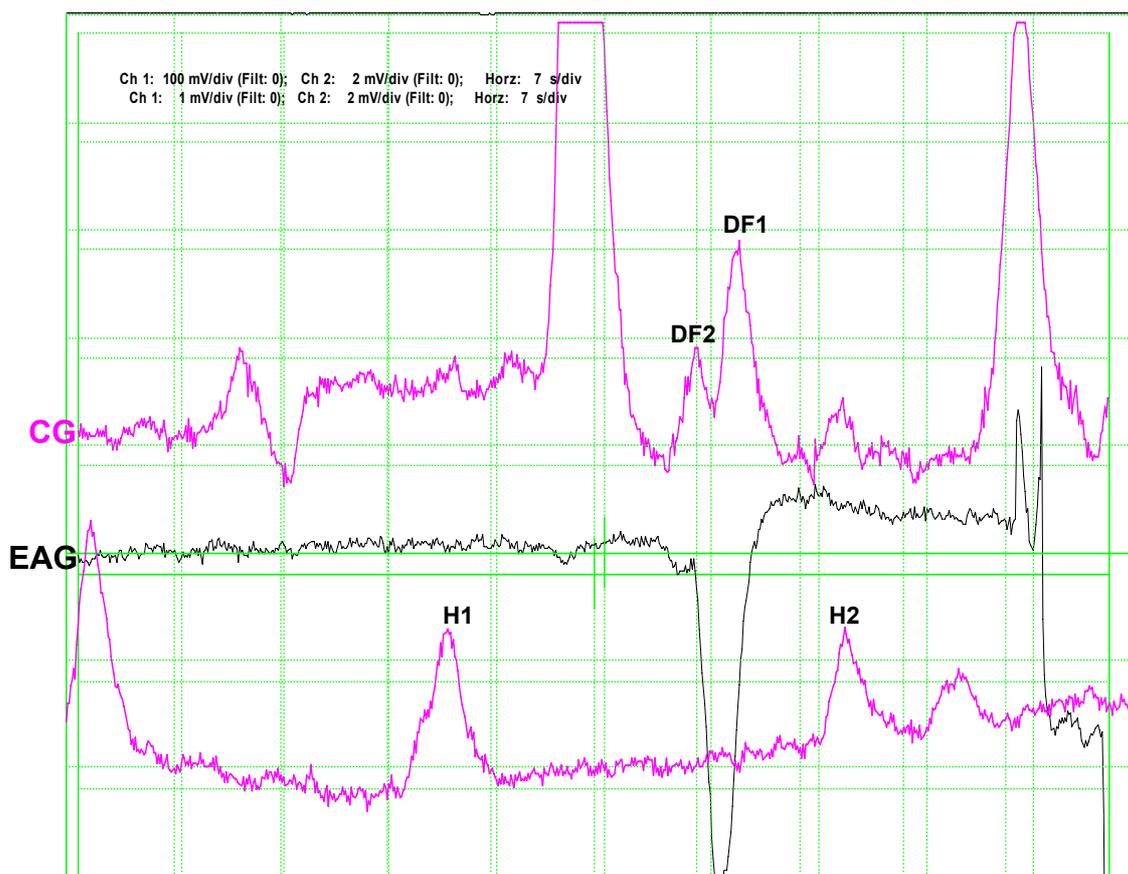


Figura 23: Análises por CG-EAG de extratos de *D. flavipennella* com 5 fêmeas equivalentes (FE) mostrando as áreas proeminentes de resposta.

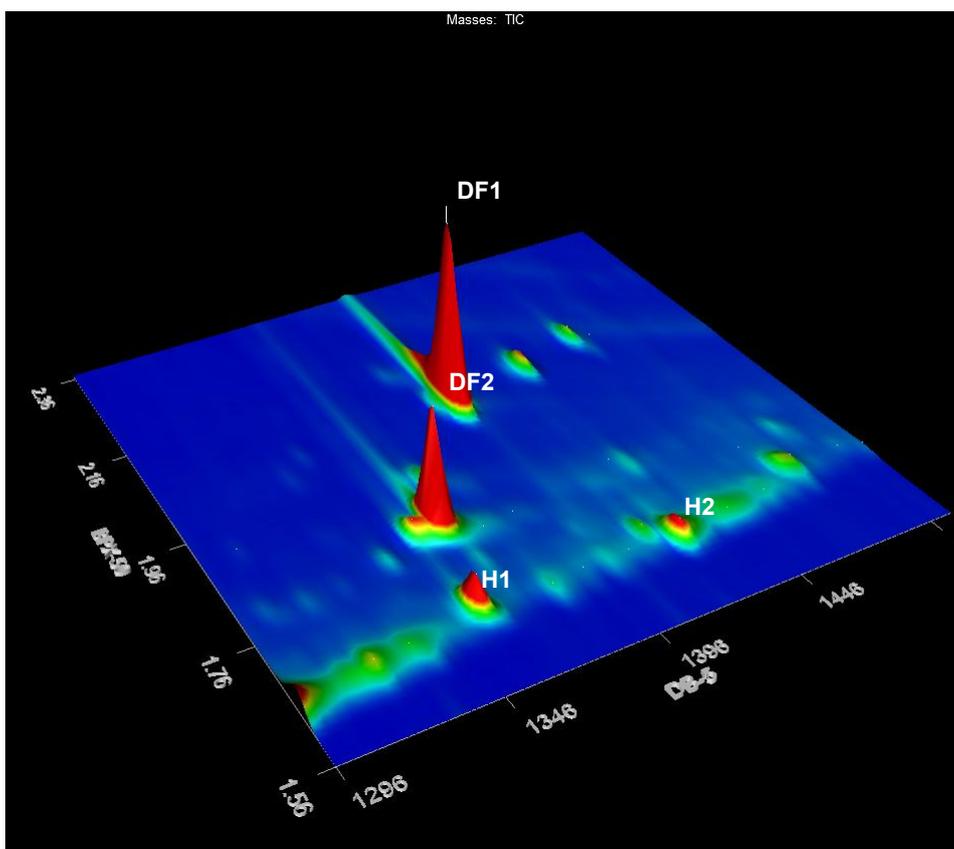


Figura 24: Análise tridimensional, por CG x CG-TOF-EM, de 1 μ L de extratos de *D. flavipennella*. As áreas em laranja mostram os picos ativos em EAG.

A detalhada investigação da área relevante no cromatograma obtido por CG x CG-TOF-EM, mostrou dois compostos, cujos espectros de massa possuem padrões de fragmentação semelhantes aos de compostos oxigenados insaturados, que contêm uma ligação dupla e uma cadeia carbônica com peso molecular e nº de carbonos próximos aos hidrocarbonetos identificados como H1 e H2.

Esses compostos foram identificados como DF1 e DF2. Suas identidades foram confirmadas por injeção de padrões sintéticos preparados no laboratório e também pela reação com DMDS.

Os compostos presentes no extrato hexânico de fêmeas de *D. flavipennella* foram convertidos no seu di (metil-tio) éteres mediante reação com dimetildissulfeto e submetidos a análises por CG x CG-TOF-EM.

Os espectros de massas dos derivados do DMDS apresentaram fragmentos iônicos que indicaram a localização precisa da ligação dupla nestas moléculas.

As áreas e tempo de retenção (omitidos) do DF1 e DF2, identificados nos extratos de fêmeas de *D. flavipennella*, são condizentes com os compostos ativos em EAG e foram pareados com ambas as dimensões do CG com elevada precisão (Tabela 2). O comportamento de retenção dos padrões sintéticos correspondentes ao DF1 e DF2 acompanhou, da mesma forma o comportamento dos compostos EAG-ativos em experimentos CG-EAG subsequentes (figuras 25 e 26).

Soluções dos compostos sintéticos DF1 e DF2 eliciaram reações antenais significativas quando injetados individualmente em CG-EAG. A correspondência do comportamento de retenção dos sintéticos e dos compostos presentes nos extratos de *D. flavipennella* em ambos experimentos, CG-EAG e CG x CG-TOF-EM, suportaram a identificação.

Tabela 2: Área percentual dos compostos feromonais de *D. flavipennella* (os quais foram ativos em CG-EAG) e sintéticos, DF1 and DF2 em análises por CGxCG-TOF-EM.

| Compostos identificados | Area (%) | Compostos padrões |
|-------------------------|----------|-------------------|
| DF1* | 24.146 | DF1 |
| DF2* | 75.854 | DF2 |
| DF3 | | - |
| DF4 | | DF4 |
| DF5 | | - |
| DF6 | | - |
| | | H1 |
| | | H2 |

* Compostos que eliciaram atividade EAG e eluídos entre H1 e H2.

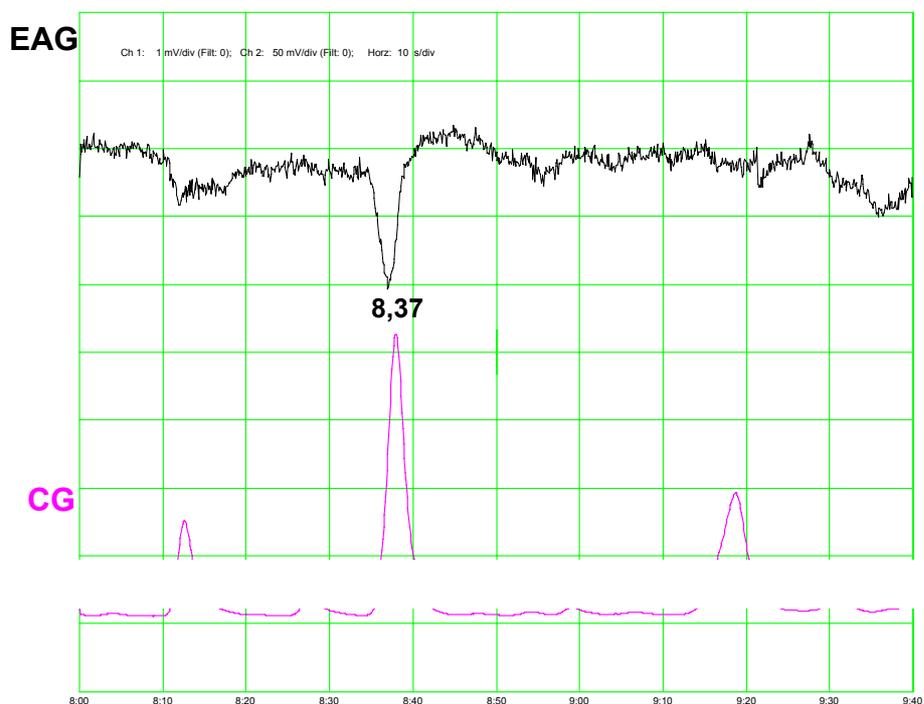


Figura 25: Registro de CG-EAG para solução de DF1

EAG

CG

Figura 26: Registro de CG-EAG para solução de DF2

A análise semiquantitativa dos compostos ativos em EAG com amostras padrões baseadas na comparação das áreas de pico, revelaram a razão de DF1 e DF2 como sendo de 3:1, respectivamente. Análises cuidadosas de extratos da glândula feromonal por CG x CG-TOF-EM também mostraram a presença de quatro outros compostos relacionados. Estes foram identificados como DF3, DF4 e DF5. Nenhum destes compostos apresentaram comportamento de retenção em comparação com compostos ativos em EAG ou foram EAG ativos.

5.5. Análise comportamental, em laboratório, do feromônio sexual de *D. flavipennella*

A tabela 3 apresenta a comparação dos valores médios de cada mistura testada em relação ao tratamento controle (fêmeas vivas). As médias foram transformadas para $(\sqrt{x} + 0,5)$ devido a homocedasticidade das variáveis tornando-as mais homogêneas. Para as variáveis AA (agitação de asas) e PAC (pouso no papel de filtro com abertura de cláspes) empregou-se o teste T3 de Dunnett, e para as variáveis PP (pouso e permanência no papel de filtro) e TC (tentativa de cópula), o teste C de Dunnett, ambos com probabilidade de erro experimental inferior a 5% ($p < 0,05$). As misturas 1, 2, 4 e 5 não diferiram significativamente do controle (fêmeas vivas) para as variáveis AA e PP. Para PAC, observou-se similaridade estatística das misturas 2, 4 e 5 em relação ao controle. Para a variável TC, todos os tratamentos não diferiram estatisticamente do tratamento controle.

De acordo com estes resultados, a resposta dos machos de *D. flavipennella* às misturas sintéticas representadas pelas misturas 2 e 4 são semelhantes à resposta que os mesmos apresentam diante de extratos de fêmeas de *D. flavipennella* (tratamento 5) e fêmeas vivas (tratamento controle).

No entanto, considerando que a mistura feromonal (mistura 4) é composta apenas por DF1 e DF2, é possível observar que a presença do isômero DFi na mistura representada pela mistura 2, não exerceu um efeito inibidor na resposta dos machos.

A partir desses resultados, podemos concluir que a mistura sintética representada por 75% de DF1 e 25% de DF2 é de fato, a mistura feromonal sexual liberada por fêmeas de *D. flavipennella* em chamamento.

Tabela 3. Médias observadas, médias transformadas e valores de probabilidade (*P*) obtidos para as variáveis (comportamentos) analisadas

| Mistura de compostos | Médias das variáveis analisadas | | | |
|---------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | AA ^{1,*} | PP ² | PAC ^{1,*} | TC ² |
| DF1:DF2:DFi (Misturas) | | | | |
| 75:5:20 | 4,50 a (2,62) ³ P=0,716 | 8,25 a (3,37) p=0,475 | 4,75 b (2,68) p=0,001 | 2,00 a (1,89) p=0,834 |

| | | | | |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| (mistura 1) | | | | |
| 80:10:10 | 4,25 a | 7,00 a | 11,50 a | 2,25 a |
| | (2,53) | (3,03) | (3,81) | (1,86) |
| (mistura 2) | | | | |
| | P=0,969 | p=0,170 | p=1,00 | p=0,872 |
| 50:20:30 | 2,50 b | 2,25 b | 0,75 b | 0,25 a |
| | (2,07) | (1,96) | (1,10) | (0,75) |
| (mistura 3) | | | | |
| | P=0,034 | p=0,002 | p=0,019 | p=0,207 |
| 75:25:00 | 4,75 a | 12,00 a | 10,0 a | 2,25 a |
| | (2,68) | (3,91) | (3,66) | (1,96) |
| (mistura 4) | | | | |
| | P=0,969 | p=0,992 | p=0,548 | p=0,729 |
| Extrato de fêmeas | 4,75 a | 5,75 a | 9,00 a | 0,75 a |
| | (2,74) | (2,82) | (3,38) | (1,25) |
| (tratamento 5) | | | | |
| | P=0,969 | p=0,079 | p=0,932 | p=0,918 |
| Fêmeas vivas | 5,00 a | 14,0 a | 12,0 a | 1,50 a |
| (controle) | (2,56) | (4,12) | (3,96) | (1,54) |

¹ Letras iguais na mesma coluna indicam similaridade dos extratos em relação ao das fêmeas vivas pelo teste de Dunnett T3 ($p < 0,05$).

² Letras iguais na mesma coluna indicam similaridade dos extratos em relação ao das fêmeas vivas pelo teste de Dunnett t ($p < 0,05$).

³ **Valores transformados em $(\sqrt{x + 0,5})$.**

* Heterocedasticidade existente nas respectivas variáveis

6. Discussão

O potencial reprodutivo em lepidópteros depende de inúmeros fatores, tanto fisiológicos quanto comportamentais. Entre eles está o comportamento de corte, acasalamento, maturação dos ovos e procura de locais apropriados para a oviposição (Svensson et al. 1998). A exemplo deste trabalho, estudos realizados para determinar estes aspectos em lepidópteros geralmente têm verificado a influência da idade de machos e fêmeas e outros fatores endógenos e exógenos no sucesso reprodutivo, seja em menor ou maior grau.

Os resultados do comportamento de chamamento de fêmeas de *Diatraea flavipennella* estão em concordância com o padrão de chamamento observado em outros lepidópteros tais como, *D. considerata*, *Euxoa declarata*, *Tuta absoluta*, *Mocis latipes*, *Neoleucinoides elegantis*, *Leucoptera cafeella*,

Argyrotaenia sphaleropa and *Thyrinteina arnobia* (Osório & Tovar, 2000; Hickel *et al.*, 1991, Lima *et al.*, 1998; Eiras, 2000; Michereff *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2005, Batista *et al.*, 2004, Teal & Byers, 1980). Elas são mariposas que se movimentam muito pouco durante a escotofase, permanecendo a maior parte do tempo em comportamento de chamamento, demonstrando um padrão contínuo por períodos longos.

Está bem documentado que muitas atividades comportamentais em lepidópteros, incluindo chamamento, produção de feromônio sexual e acasalamento, são restritos a certas horas do dia, usualmente na fase escura (Sower *et al.*, 1971; Beck, 1980; Teal *et al.*, 1981; Pope *et al.*, 1984; Raina *et al.*, 1986). Fêmeas de *D. flavipennella* manifestaram o comportamento de chamamento nas primeiras horas da escotofase (a partir da segunda hora) e nos primeiros dias de vida.

Insetos que apresentam tais características são geneticamente programados para começar a atividade reprodutiva logo após a emergência, pois são capazes de alcançar a maturidade utilizando reservas alimentares do estágio larval para sustentar o desenvolvimento reprodutivo. Além disso, esse comportamento aumenta a probabilidade das fêmeas atraírem mais cedo um parceiro para o acasalamento, reduzindo a competição com as fêmeas de menor condição fisiológica (Batista *et al.*, 2004).

De modo geral, o chamamento de mariposas fêmeas é caracterizado pela protusão dos segmentos abdominais acompanhado pela elevação do abdomen com exposição concomitante da glândula produtora de feromônio, a qual libera o feromônio sexual volátil através de um fluxo de ar gerado pelo movimento das asas (Itagaki & Conner, 1988). Em resumo, os resultados determinam o tempo em que as glândulas de fêmeas de *D. flavipennella* podem ser extraídas para identificação do feromônio sexual

O comportamento de corte e acasalamento exibido por machos e fêmeas de *D. flavipennella*, descritos no presente estudo, caracterizaram-se por uma sequencia de movimentos estereotipados, incluindo vibração de asas e exibição de cláspes do macho diante da fêmea durante a corte além de cópula contínua por mais de uma hora. Comportamentos similares foram descritos para vários lepidópteros (Baker & Cardé, 1979, Turgeon *et al.*, 1987, Bento *et al.*, 2001c, Batista *et al.*, 2004, Eiras, 2000). Durante a corte, insetos

machos tipicamente utilizam diferentes sinais, frequentemente em mais de uma modalidade sensorial. A probabilidade de aceitação da fêmea é influenciada pela intensidade do comportamento de corte (Ringo, 1996).

Para mariposas, de modo geral, o número de acasalamentos varia de acordo com a espécie. Fêmeas de mariposas tais como *C. consueta*, acasalam 2,5 vezes durante sua vida enquanto fêmeas de *Spodoptera frugiperda* acasalam em média 6,7 vezes (Rojas & Cibrian-Tovar, 1994; Simmons & Marti, 1992). Por outro lado, fêmeas de *Chilo partellus* e *D. considerata* acasalam somente uma vez (Unnithan & Paye, 1991; Osório-Osório & Cibrián-Tovar, 2000). A partir deste trabalho também ficou estabelecido que fêmeas de *D. flavipennella* acasalam somente uma vez, independente da proporção sexual.

O conhecimento dos fatores que regulam a poligamia ou monogamia em lepidópteros é interessante não somente em termos de comportamento, ecologia e sucesso reprodutivo da fêmea ou macho, mas também a partir do ponto de vista de espécies pragas. Por exemplo, fêmeas poligâmicas podem competir com o atraente sexual em armadilhas visando o monitoramento da população em programas de manejo integrado de pragas, confundindo a interpretação dos dados de captura (Torres-Vila et al., 1997).

De acordo com este ponto de vista o fato de fêmeas de *D. flavipennella* acasalarem somente uma vez pode ser considerado com o fator positivo e muito interessante.

Na maioria das mariposas, um importante neuropeptídeo chamado *female sex Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide* (PBAN), controla a produção de feromônio sexual em fêmeas, o qual é mediado por sinais humorais, hormonais ou neurais (Raina, 1993; Rafaeli, 2002). O acasalamento cessa a produção de feromônio sexual em muitas mariposas, tais como: *Helicoverpa zea* (Raina, 1989), *Heliiothis viresces* (Ramaswamy et al., 1996), *Lymantria díspar* (Giebultowicz et al., 1991), *Argyrotaenia velutiana* (Jurenka et al., 1993), *Choristoneura fumiferana* e *C. rosaceana* (Deslile & Simard, 2002), pela inibição da produção de PBAN.

Alguns estudos também sugerem que o tamanho do espermatóforo do macho transferido para a fêmea durante o acasalamento pode causar uma inibição de acasalamento. Quanto maior o tamanho maior será o tempo que a fêmea permanecerá não receptiva ou simplesmente não re-acasale. Esta

relação entre tamanho de espermatozóide e poligamia tem um importante aspecto evolucionário, uma vez que a seleção pode favorecer machos com elevado potencial de acasalamento por possuírem alta capacidade de gerar grandes espermatozóides fato este que diminui o risco de competição de esperma derivado de acasalamentos subseqüentes (Parker & Simmons, 1989; Taylor, 1967).

Fisiologicamente, esta inibição pode ser interpretada por alguns mecanismos sinérgicos interrelacionados: a pressão do espermatozóide nos nervos receptores da bursa copulatrix da fêmea (Seth *et al.* 2002), a transferência de fatores humorais para a fêmea na ejaculação (Santhosh-Babu & Prabhu, 1987) e a presença de eupireno (esperma fertilizado nucleado) na bursa copulatrix (Arnqvist & Nilsson, 2000). Uma vez que adultos de *D. flavipennella* levam mais de uma hora para completar a cópula, é razoável afirmar que estes mecanismos também podem ser válidos para esta espécie.

A decisão da implementação da estratégia de confundimento em sistemas de manejo integrado de pragas é complexa e altamente dependente destes conhecimentos básicos relacionados a bionomia e ecologia do inseto-alvo.

Os dados de CG-EAG, CG x CG-TOF-EM e bioensaios em laboratório demonstraram que o feromônio sexual produzido pelas fêmeas de *D. flavipennella* consiste de compostos oxigenados tais como alguns feromônios sexuais identificados para espécies de lepidópteros já estudadas. Nestas espécies, os feromônios substituem, de forma eficiente, fêmeas virgens em ensaios com túnel de vento e armadilhas utilizadas para monitoramento (Hedin *et al.*; 1986; Gries, *et al.*; 1998; Batista, *et al.*; 2002; Kalinová *et al.*; 2005; Davis, *et al.*; 1986).

Os feromônios são excelentes ferramentas para controlar a ocorrência e densidade de pragas ou para estudar a dinâmica populacional. Em muitos casos, eles são também utilizados com sucesso em muitos métodos de controle direto como coleta massal ou interrupção de acasalamento (Parra *et al.*; 2002).

Para a obtenção de um feromônio sexual sintético de um inseto são imprescindíveis várias etapas (figura 27). Para a identificação do feromônio sexual de *D. flavipennella*, foram necessárias as etapas de 1 a 2, já

desenvolvidas pelo nosso grupo (Freitas *et al*; 2006; Freitas *et al*; 2007). As etapas de 3 a 6 foram desenvolvidas no presente trabalho. As etapas de 7-10 deverão ser executadas em estudos futuros para disponibilizar o produto no mercado. Este feromônio apresenta um enorme potencial, porém necessita ainda ser investigado sob o ponto de vista de sua aplicação nos canaviais.

Assim, deverão ser realizados estudos para o estabelecimento de estratégias de uso deste feromônio no monitoramento para controle desta broca, dentro da filosofia do manejo integrado de pragas. Para tanto determinar-se-á:

- (i) A concentração ideal da mistura feromonal por septo impregnado;
- (ii) A formulação ideal dos dois componentes nos testes de campo;
- (iii) A altura ideal de instalação das armadilhas nas plantas de cana-de-açúcar;
- (iv) Cor, formato e tamanho ideais de armadilhas as quais permitam uma captura eficiente de machos;
- (v) Número de armadilhas a ser utilizado por área,
- (vi) Eficiência da captura do feromônio em diferentes regiões sob diferentes condições ambientais de temperatura, altitude, umidade relativa do ar, etc.

Estas futuras pesquisas serão fundamentais para que o feromônio sexual sintético possa ser considerado eficiente em condições de campo e seja disponibilizado aos produtores, contribuindo desta forma, para redução de custos de produção e acima de tudo na sustentabilidade ambiental.

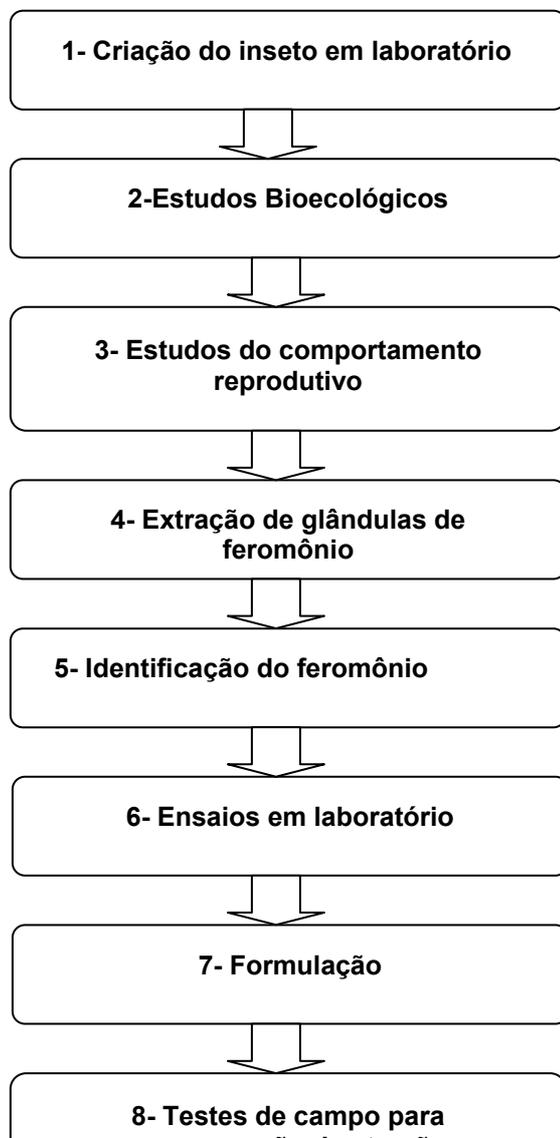


Figura 27: Etapas para obtenção do feromônio sexual sintético de *Diatraea flavipennella* (Adaptado de Parra-Pedrazolli, 2006)

7. Considerações finais

Insetos adultos de *D. flavipennella*, exibem comportamento de corte e acasalamento que evidencia a produção de feromônio sexual. Essa produção se dá em maiores quantidades após nove horas do início da atividade de chamamento para fêmeas de dois dias de idade. Em se tratando de frequência de acasalamento, fêmeas de *D. flavipennella* acasalam uma única vez, independente da razão sexual, fato este que maximiza o seu uso em armadilhas de campo uma vez que não existiria competição com as fêmeas selvagens, acasaladas.

Por sua vez, a mistura feromonal sintética é binária e formada por compostos oxigenados, denominados DF1 e DF2, os quais eliciam respostas em machos, através de análises por EAG e bioensaios em laboratório, tão significativas quanto fêmeas virgens. Finalmente, esta mistura ocorre na proporção de 3:1 (DF1:DF2) e não é influenciada por compostos isoméricos.

Anexos

Artigos publicados nos últimos cinco anos.

1. Referentes ao **tema em estudo**:

- MENDONÇA, A.L.; FREITAS, M.R.T.; CABRAL JR., C.R.; MESQUITA, F.L.; CORREIA, A.M.O.; DO NASCIMENTO, R.R.; SANT'ANA, A.E.G. **Reproductive Behaviour of *Diatraea flavipennella*** (Lepidoptera: Crambidae). *Ethology*. (submetido), 2009.
- FREITAS, M. R. T., SILVA, E. L., MENDONCA, A. L., SILVA, C. E., FONSECA, A. P. P., LIMA-MENDONÇA, A., SANTOS, J. S., DO NASCIMENTO, R. R., SANT'ANA, A. E. G. **The biology of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) reared under laboratory conditions**. *The Florida Entomologist*. , v.90, p.309 - 313, 2007.

- FREITAS, M. R. T., FONSECA, A. P. P., SILVA, E. L., MENDONCA, A. L., SILVA, C. E., LIMA-MENDONÇA, A., DO NASCIMENTO, R. R., SANT'ANA, A. E. G. **The predominance of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane fields in the State of Alagoas.** *The Florida Entomologist.* , v.89, p.539 - 540, 2006.

2. Referentes à ordem Lepidoptera

MENDONCA, A. L., FREITAS, M. R. T., DO NASCIMENTO, R. R., SANT'ANA, A. E. G., SILVA, C. E., SILVA, E. L., GONCALVES, G. B. **Reproductive behaviour of the Annona fruit borer, *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Oecophoridae).** *Ethology.* , v.112, p.971 - 976, 2006.

3. Referentes à ordem Hymenoptera

- MENDONÇA, A.L.; SILVA, C.E.; MESQUITA, F.L.T.; CAMPOS, R.S.; DO NASCIMENTO, R.R.; XIMENES, E.C.P.; SANT'ANA, A.E.G. **Antimicrobial activities of components of the glandular secretions of leaf cutting ants of the genus *Atta*.** *Antonie Van Leeuwenhoek.* V. 95, p.295-303. 2009
- FRANCELINO, M.R.V., MENDONCA, A. L., DO NASCIMENTO, R. R., MENDONCA, F. A. C., SILVA, E. L., FREITAS, M. R. T., CABRAL JR, C.R., SILVA, C. E., RIBEIRO, J.H.S., SANT'ANA, A. E. G. **Polyethism and nestmate recognition in the alarm reaction of *Atta* leaf-cutting ants.** *Physiological Entomology.* , v.33, p.37 - 42, 2008.
- FRANCELINO, M.R.V., MENDONCA, A. L., DO NASCIMENTO, R. R., SANT'ANA, A. E. G. **The mandibular gland secretions of the leaf-cutting ants *Atta sexdens sexdens* and *A. opaciceps* exhibit inter-caste and inter-colony variation.** *Journal of Chemical Ecology.* , v.32,

p.646 - 655, 2006.

- MENDONCA, A. L., FREITAS, M. R. T., SANT'ANA, A. E. G., DO NASCIMENTO, R. R. **Behavioural evidence for a female sex pheromone in *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae).** *Physiological Entomology* (Print). , v.29, p.183 - 187, 2004.

4. Referentes à ordem Diptera

- GONCALVES, G. B., SILVA, C. E., SANTOS, J. C. G., DO NASCIMENTO, R. R., SILVA, E. L., MENDONCA, A. L., FREITAS, M. R. T., SANT'ANA, A. E. G. **Comparison of the volatile components released by calling males of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) with those extractable from the salivary glands.** *The Florida Entomologist*. , v.89, p.375 - 379, 2006.

9. Referências Bibliográficas

Agosta, W.C. *Chemical Communication: The language of pheromones*. Scientific American Library. 179p., **1990**.

Almeida, L.C.; Macedo, N.; Botelho, P.S.M.; Araújo, J.R.J.; Degaspari, N. *Congress of the ISSCT*, 18, Cuba, 2, 607-625, **1983**.

Andersson, J., Borg-Karlson, A.K. e Wiklund, C. *Journ of Chem. Ecol.* **2003**, 29: 1489-1499.

Arencibia, A., Vazquez, R.I., Prieto, D., Tellez, P., Carmona, E. R., Coego, A., Hernandez, L., Delariva, G.A. & Selmanhousein, G. *Mol. Breed.* **1997**, 3, 247-255.

Arnqvist, G.; Nilsson, T. *Animal Behaviour.* **2000**, 60, 145-164.

Attygalle, A.B.; Jhan, G.N.; Svatos, A.; friguette, R.T.S.; Meinwald, J.; Vilela, E.F.; Ferrara, F.A.; Uchoa-Fernandes, M.A. *Tetrahedron Letters*. **1995**, 36, 5471-5744.

Baker, P.S., Khan, A., Mohyuddin, A. I., Waage, J. K. *Fla. Entomol.* **1992**, 75, 477-483.

Baker, T.C. & Cardé, R.T. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1979**. 72, 173-188.

Batista-Pereira, L.G.; Santangelo, E. M.; Stein, K.; Unelius, C. R.; Eiras, A. E.; Correa, A. Z. *Naturforsch.* **2002**, 57c, 753-758.

Batista-Pereira, L.G.; Wilcken, C.F., Pereira-Neto, S.D.; Marques, E.N. *Neotropical Entomology*. **2004**, 33(1), 21-28.

Beck, S. *Insect Periodism*. Academic Press, New York. **1980**.

Bento, J.M.S. In: In: Vilela, E.F.; Della Lucia, T.M.C.(eds). *Feromônios de insetos: Biologia, química e aplicação*. Holos. 135-144, **2001b**.

Bento, J.M.S.; Parra, J.R.P.; Vilela, J.M.W.; Leal, W.S. *Journ. Of Chem. Ecol.* **2001c**. 27, (10), 2053-2065.

Bento, J.M.S.; Vilela, E.F.; Della-Lucia, T.M.C. In: In: Vilela, E.F.; Della Lucia, T.M.C. (eds). *Feromônios de insetos: Biologia, química e aplicação*. Holos. 147-150, **2001a**.

Beroza, M.; Bierl, B. *Anal. Chem.* **1966**, 38, 1976-1977.

Beroza, M.; Sarmiento, R. *Anal. Chem.* **1966**, 38, 1042-1047.

Bjostad, L.B.; Jewett, D.K.; Brigham, D.L. *Journ. Chem. Ecol.* **1996**, 22, 103-120.

Botelho, P.S.M.; Mendes, A.C. *Brasil Açucareiro.* **1978**, 92, 9-14.

Canaoeste, *Associação do Plantadores da Cana do Oeste do Estado de São Paulo.* **2009.**

(www.canaoeste.com.br/principal.php?xvar=ver_np_ind&xid_noticia=1133, acesso em 10/03/2009).

Cardé, R.T.; Minks, A.K.. *Annual review of Entomology*, **1995**, 40, 559-585.

Carney, R.L.; Liu, A.S.T. U.S.Pat. 1,357,474. *Chem Abstr.* **1983**, 98, 125738b.

Cividanes, T.M.S. *Workshop Agroenergia 2008-APTA-Regional*, Ribeirão Preto, Brasil, **2008.**

Contreras Duran, J.V. *Dissertação de mestrado*, Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz-Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, 1980.

Cork, A.; Boo, K.S.; Dunkelblum, E.; Hall, D.R.; Jee-Rajunga, K.; Kehat, M.; Kong Jie, E.; Park, K.C.; Tepgidagarm, P.; Lui Xun. *Journ. Chem. Ecol.* **1992**, 18,403-418.

Davis, F.M.; Bird, T.G.; Knutson, D.E. *Journ. Econ. Entom.* **1986**, 79, 1385-1389.

Degaspari, N.; Botelho, P.S.M.; Almeida, L.C.; Macedo N.; Araújo, J.R.A. *STAB-Açúcar, álcool e sub-produtos.* **1983**, 1, 35-40.

Deslile, J. & Simard, J. *Journ. Insect Physiol.* **2002**, 48, 181-188.

Dimandja, J.M.D. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 167A.

Eiras, A.E.: *Ann. Soc. Entomol. Brasil.* **2000**, 29 (3), 453-460.

Ferreira, J.T.; Corrêia, A.G; Vieira, (Eds). *Produtos naturais no controle de insetos*. Editora da UFSCAR. 176p, **2001**.

Flores, S. *Las plagas de La Caña de azúcar em México*. México D.F. 350p.**1994**.

Freitas, M. R. T., Fonseca, A. P. P., Silva, E. L., Mendonça, A. L., Silva, C. E., Mendonca, A. L., DO Nascimento, R. R., Sant'ana, A. E. G. *The Florida Entomologist.* **2006**, 89, 539-540.

Freitas, M. R. T., Silva, E. L., Mendonça, A. L., Silva, C. E., Fonseca, A. P. P., Mendonca, A. L., Santos, J. S., DO Nascimento, R. R., Sant'ana, A. E. G. *The Florida Entomologist.* **2007**, 90, 309-313.

Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., R. P. L., Batista, G. C., Berti Filho, E., Parra, J. R. P., Zucchi, R. A., Alves, S. B.; Vendramin, N, J. D. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba, Ed. FEALQ, 2^a ed., 649 p, **2002**;

Giebultowicz, J.M.; Raina, A.K.; Vebel., E.C.; Ridgway, R.L. *Arch. Insect Biochem.* **1991**. 16: 95-105.

Greenfield, M.D. & Karandinos, M.G. *Ecol. Monogr.* **1979**, 49, 403-426.

Gries, R.; Dunkelblum, E.; Gries, G.; Baldilla, F.; Hernandez, C.; Alvarez, F.; Perez, A.; Velasco, J.; Oehlschlager, A. C. *J. Appl. Entomol.* **1998**, 122, 265-268.

Guagliumi, P. *Pragas da Cana-de-açúcar (Nordeste do Brasil)*. Rio de Janeiro: IAA. 622p, 1972.

Hammond, D.A.M.; Hensley, S.D.; *Entomophaga*. **1971**, 16, 159-164.

Han, E. & Gatehouse, A.G. *Bull. Entomol. Res.* **1991**, 81, 385-400.

Hedin, P. A.; Davis, J. C., Dickens, M. L.; Burks, T. G.; Knutson, A. E. *J. Chem. Ecol.* **1986**, 12:, 2051-2063.

Hickel, E.R., Vilela, E.F., Lima, J.O.G., Della Lucia, T.M. C. *Pesq. Agropec. Bras.* **1991**, 26, 827-835.

Howlander, M.A. & Gerber, H.G. *Can. Entomol.* **1986**, 118, 735-743.

Interacta Química. **2009**. (www.interactaquímica.com.br acesso em 10/03/2009).

Il'Chev, A.L.; Williams, D.G. & Milner, A.D. *Journal of Applied Entomology*, **2004**, 128(2), 126-132.

Itagaki, H.; Conner, W.E. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1988**. 81, (5), 789-807.

Jornal da Cana, *Bendita revolução Energética*. **2007**. 168: p. 22.

Jurenka, R.A.; Fabrias, G.; Ramaswamy, S.; Roelofs, W.L. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1993**. 24, 947-957.

Kalinová, B.; Jiros, P.; Zd'arek, J.; Wen, Xiujun; Hoskovec, M. *Talanta*. **2006**, 69, 542-547.

Kalinova, B.; Kindl, J.; Hovorka, O.; Hoskovec, M.; Svatos, A.. *JEN*. **2005**, 129 (2), 70-74.

Kalinová, B.; Savttos, A.; Kindl, J.; Hovorka, O.; hrady, I.; kuldová, J.; Hoskovec, M. *Joun. Chem. Ecol.* **2003**, 29, 387.

Karalius, V.; Buda, V. *Pheromones*. **1995**, 5, 169-190.

Karube, F.; Kobayashi, M. *Archives insects Biochemistry and Physiology*. **1999**, 42:111-118.

Kou, R. & Chow, Y.S. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1987**, 80, 490-493.

Lanier, G.N. In: Ridgway, L.R.; Silverstein, R.M; Inscoll, M.N. (eds). *Behaviour modifying Chemicals for insect management*. Marcel Dekker. 25-45. **1990**.

Leal, W.S.; Kwara, X.; Matsuyana, S.; Susuzi, T.; Ozaua, T. *Journ. Braz. Chem. Soc.* **1992**, 3, 25-29.

Lima, E.R., Vilela, E.F. & Sanchez, G.R.. *Ann. Soc. Entomol. Brasil.* **1998**, 27(1), 9-19.

Loeck, A.E.; Bertoldi, L.H.M.; Salles, L.A.B. 1991. *Ann. Soc. Entom. Bra.* **1999**, 10,43-49.

Lopes, J.J.C.; Degaspari, N.; Botelho, P.S.M.; Leme, J.R.A.; Ferrari, S.E.; Almeida, L.C. *Proceed. of Intern. Soc. Of Sugar Cane Tech.* **1983**, 18, 902-909.

Lopes, J.J.C.; Degaspari, N.; Botelho, P.S.M.; Leme, J.R.A.; Ferrari, S.E.; Almeida, L.C. *Proceed. Intern. Soc. Sugar Cane Tech.* **1983**, 18, 902-909.

Macedo, N.; Araújo, J.R.. *Ann. Soc. Entomol. Brasil.* **2000**, 29 (1), 71-77.

Mendonça, A. F.. *Pragas da cana-de-açúcar*. Editora A. F. Mendonça Filho Consultoria "Insetos e CIA". Maceió, 240 p, **1996**.

Michereff, M.F.F., Vilela, E.F., Filho, M.M., Nery, D.M.S. & Thiebaut, J.T. *The Royal Entomological Society.* **2004**, 6, 241-247.

Osório-Osório, R. & Cibrián-Tovar, J. *Agrociência.* **2000**, 34 (5), 595-602.

Parker, G.A. & Simmons, L. *Ethology.* **1989**. 82, 3-26.

Parra, J.R.P., Botelho, P. S. M., Corrêa-Ferreira, B.S., & Bento, J. M. S. (Ed). *Controle Biológico Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores*. São Paulo: Ed. Manole. 635p., **2002**.

Parra-Pedrazzoli, A.L. *PhD thesis*. Escola Superios de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, **2006**.

Patrick, J.C.; Hensley, S. D.. *J. Econ. Entomol.* **1970**, 63, 1341-1342.

Perez, R.; Hensley, S.D.; *Journ. Agric. Univ. Puerto Rico.* **1973**, 57, 320-329.

Phillips, J.B.; Beens, J. *Journ. Cromatrog. A.* **1999**, 856, 331-347.

Pinto, A. P., Sant'Ana, J., Botton, M. *Iheringia, Ser. Zool.* **2005**,95(4), 435-440.

Pope, M.M.; Gaston, L.K.; Baker, T.C. *Journal of Insect Physiology.* **1984**. 30: 943-945.

Rafaeli, A. *Intern. Ver. Cytol.* **2002**. 213, 49-92.

Raina, A.K. *Ann. Rev. Entomol.* **1993**. 39, 329-349.

Raina, A.K. *Journ. Insect. Physiol.* **1989**. 35, 821-826.

Raina, A.K.; Klum, J.A.; Stadelbacker, E.A. *Ann. of the Entomol. Soc. Am.* **1986**. 79, 128-131.

Ramaswamy, S.B.; Qiu, V.; Park, Y.I. *Joun. Experim. Zool.* **1996**. 274, 255-263.

Reay-Jones, F.P.F.; Akbar, W.; Mc Alister, C.D.; Reagan, T.E.; Ottea, J.A. *Journ. Econ. Ent.* **2005**, 98(3), 955-960.

Reay-Jones, F.P.F.; Akbar, W.; McAlester, C.D. Reagan, T.E.; Ottea, J.A. *Hourn. Econ.Ent.* **2005**, 3, 955-960.

Ringo, J. *Ann. Rev. Entomol.* **1996**. 41, 473-494.

Risco, S. H., Ferreira, C. E., Mendonça, A. F., Brandão, J. M., Sobral, S. M. & Souza, H. D. *Relatório Técnico - Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar (PLANALSUCAR)*. **1975**.

Roelofs, W. L. & Cardé, R.T., In M. Bich (ed.) *Pheromones*. Amsterdam North Holland Publishing., 96-114, **1974**.

Roelofs, W.L. & Cardé, R.T.. *Ann. Rev. Entomol.* **1977**, 22, 377-405.

- Rojas, J.C. & Cibrian-Tovar, J. *Pan-Pacific Entomol.* **1994**, 70, 276-282.
- Salles, L.A.B.; Marini, L.H. *Ann. Soc. Entom. Bra.* **1989**, 18, 329-336.
- Santangelo, E. M.; Correa, A. G., Unelius, C. R. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 909-915.
- Santhosh-Babu, P.B. & Prabhu, V.K.K. *Cuurent science.* **1987**. 56, 967-968.
- Schwartz, N.N.; Blumberg, J.H. *The Journ. Org. Chem.* **1964**, 29, 1976-1979.
- Setamou, M., Bernal, J. S., Legaspi, J. C., Mirkov, T.E. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2002**, 95, 75-83.
- Seth, R.K.; Kaur, J.J.; Rao, D.K.; Reynolds, S. *Physiol. Entomol.* **2002**. 27, 1-14.
- Silveira-Neto, S. Precetti, A.A.C.M.; Braz, A.J.B.P.; Santos, P.E.T. *Ann. Soc. Entom. Bra.* **1981**, 10, 43-49.
- Simmons, A.M. & Marti, O.G. *Environ. Entomol.* **1992**, 21, 371-375.
- Sindaçúcar/AL. Sindicato das Indústrias do Açúcar. Maceió, **2008**. Disponível em <www.sindacucar.al.com.br> Acesso em 20 fev. **2008**.
- Sower, L.L.; Shorey, H.H.; Gaston, L.K. *Physiol. Entomol.* **1971**. 27, 1-14.
- Stenhagen, E.; Abrahamsson, S.; Mc. Lafferty, F.W. *Registry of mass spectra data.* Wiley, **1974**, 3358.
- Svatos, A.; Attygalle, T.B.; Jham, G.N.; friguetto, R.T.S.; Vilela, E.F.; Saman, D. Meinwald, J. *Journ. Chem. Ecol.* **1996**, 2, 787-800.

Svatos, A.; Kalinova, B; Kindl, J.; Kuldova, J.; Hovorka, O.; DO Nascimento, R. R.; Oldham, N. J.. *Coll. Czech Chem. Comm.* **2001**, 66, 1682-1890.

Svatos, A.; Kalinová, B.; Hoskovec, M.; Kindl, J.; Hovorka, O.; Hrdy, I. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 7011.

Svenssson, G.E.; Marling, E. Löfqvist. *Journal. Of Insect Behavior.***1998**. 11 (3), 343-359.

Swier, S.R., Rings, R.T.W., Musick, G.J. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1977**, 70, 919-924.

Tamaki, Y..In G.a. Kermut & L.I. Gilbert (eds), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, **1985**, 9, 154-191.

Taylor, O.R. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1967**. 60, 583-590.

Teal, P.E.A.; & Byers, J.R. *Can. Entomol.* **1980**.112, 113-117.

Teal., P.E.A. Mclaughin, J.R. ; Tumlinson, J.H. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1981**. 74, 324-330.

Torres-Vila, L.M.; Stockel, J.C.; Rodriguez-Molina, C. *Physiol. Entomol.* **1997**. 22, 387-393.

Turgeon, J.J. & McNeil, J.N. *Entomol. Exp. Appl.* **1982**, 31, 402-408.

Turgeon, J.J. & McNeil, J.N. *Entomol. Exp. Appl.* **1982**, 31, 402-408.

Turgeon, J.J.; Nelson, N.; Kettela, E.G. *Can. Entomol.* **1987**, 119, 361-364.

Unelius, C.R.; Eiras, A.; Witzgall, P.; Bergtsson, M.; Kovaleski, A.; Vilela, E.F.; Borg-Karlson, A.K. *Tetrahedron Letters*. **1996**, 37, 1505-1508.

Unica – *União da Agroindústria Canavieira de São Paulo*. **2005**.
(www.unica.com.br acesso em 21/11/05).

Unnithan, G.C. & Paye, S.O. *Environ. Entomol.* **1991**, 20, 150-155.

Vendramim, J. D. In: PARRA, J. R. P., Botelho, P. S. M., Corrêa-Ferreira, B. S. & Bento, J. M. S. (eds). *Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores*. São Paulo. Ed. Manole, 511-528, **2002**.

Vilela, E.F. *Biotecnologia*. **1988**, 19,4.

Vilela, E.F., Mafrá-Neto, A.; In: Vilela, E.F.; Della Lucia, T.M.C.(eds).
Feromônios de insetos: Biologia, química e aplicação. Holos. 151-159, **2001**.

Vilela, E.F.; Della Lucia, T.M.C. (ed). *Introdução ao estudo de semiquímicos. In: Feromônio de insetos: Biologia, química e aplicação*. Holos, 9-12, **2001**.

Vilela, E.F.; Della Lucia, T.M.C. *Feromônios de insetos: Biologia, química e aplicação*. Holos., 9-12, **2001**.

Vincenti, M.; Guglielmetti, G.; Cassani, G.; Tonini, C. *Anal. Chem.* **1987**, 694-699.

Vinson, S. B. & Iwantsch, G. F. *Ann. Rev. Entomol.*, **1980**, 25, 397-419.

Wall, C. In: Ridgway, L.R.; Silverstein, R.M; Inscoll, M.N. (eds). *Behaviour modifying Chemicals for insect management*. Marcel Dekker, 9-23, **1990**.

Waquil, J.M.; Vianna, P.A.; Cruz, I. *Embrapa Milho e Sorgo-Comunicado técnico 50*. Sete Lagoas, MG, Brasil. **2002**.

Wedell, N. *The Jour. Experim. Biol.* **2005**, 208, 3433-3440.

Yasui, Y. *Trends in Ecology and Evolution*, **1998**, 13, 246-250.

Zarbin, P.H.G. In: Vilela, E.F.; Della Lucia, T.M.C. *Feromônios de insetos: Biologia, química e aplicação*. Holos. 9-12, **2001**.

Zarbin, P;H;G.; Ferreira, J.T.B.; Leal, W.S. *Quím. Nova*. **1999**, 22 (2), 263-268.