

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

**CARLOS EDUARDO DA SILVA**

**Identificação dos constituintes químicos do feromônio sexual de populações de *Anastrepha fraterculus* (DIPTERA:TEPHRITIDAE) e de seu fruto hospedeiro preferencial, Goiaba - *Psidium guajava* (Myrtaceae).**

Maceió  
2017

CARLOS EDUARDO DA SILVA

**Identificação dos constituintes químicos do feromônio sexual de populações de *Anastrepha fraterculus* (DIPTERA:TEPHRITIDAE) e de seu fruto hospedeiro preferencial, Goiaba - *Psidium guajava* (Myrtaceae).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, como requisito final para obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Orientadora:  
Prof<sup>a</sup> Dra. Ruth Rufino do Nascimento

Maceió  
2017

**Catálogo na fonte**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário Responsável: Janis Christine Angelina Cavalcante**

- S586i Silva, Carlos Eduardo da.  
Identificação dos constituintes químicos do feromônio sexual de populações de *Anastrepha farteculus* (Diptera: Thephritidae) e de seu fruto hospedeiro preferencial, goiaba – *Psidium guajava* (Myrtaceae). / Carlos Eduardo da Silva. – 2017.  
96 fls.: grafs., tabs., color.
- Orientador: Ruth Rufino do Nascimento.  
Tese (Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2017.
- Bibliografia: f. 81-91.  
Apêndices: 92-96.
1. Feromônios. 2. Moscas das frutas. 3. Atratividade sexual. 4. Biopolímeros. 5. Semioquímicos. I. Título.

CDU: 543:577.9

CARLOS EDUARDO DA SILVA

**Identificação dos constituintes químicos do feromônio sexual de populações de *Anastrepha fraterculus* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) e de seu fruto hospedeiro preferencial, Goiaba – *Psidium guajava* (Myrtaceae)**

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

Aprovada em: 09/06/2017.

BANCA EXAMINADORA

*Rev. Rev. do Livro*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ruth Rufino do Nascimento (Orientadora)  
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

*Adriana de Lima Mendonça*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana de Lima Mendonça  
Centro Universitário Tiradentes - UNIT

*João Gomes da Costa*

Pesq. Dr. João Gomes da Costa

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Tabuleiros Costeiros

*Josealdo Tonholo*

Prof. Dr. Josealdo Tonholo  
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

*Marília Oliveira Fonseca Goulart*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marília Oliveira Fonseca Goulart  
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

A toda minha família, em especial, aos meus Pais, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem incondicionalmente.

Dedico.

À minha esposa **Maíra**, por me apoiar e compreender a necessidade de minhas tantas ausências e, à **Alice**, meu mais novo amor incondicional, que me nutre diariamente com seu doce sorriso....

Ofereço.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela saúde de todos os dias e por me conceder a coragem para sempre seguir em frente com o objetivo de descobrir e trilhar novos caminhos.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Ruth Rufino do Nascimento, pelo carinho, dedicação, orientação, amizade e exemplo de profissionalismo e, por sempre acreditar em meu potencial, além de ter me acolhido após oito longos anos afastado do Laboratório de Ecologia Química.

Ao grande amigo-irmão Raphael Tavares, peça-chave para realização deste trabalho, por sua valiosa amizade durante esses anos de curso.

À Dra. Adriana de Lima Mendonça, pelas orientações e amizade que perduram desde os tempos da graduação;

À Dra. Lucie Vaníčková, pela valiosa colaboração nas análises químicas e pela amizade durante sua estadia no Brasil.

A todos os alunos do Laboratório de Ecologia Química – em especial: Nathaly Aquino, Luana Ferreira, cujas contribuições foram cruciais e sem as quais a realização deste trabalho não seria possível.

A Joubert de Alencar Gonçalves, por toda a ajuda prestada desde os tempos de graduação e, pela amizade.

A todos de minha família, por sempre acreditarem no meu potencial, o que me faz crer que posso sempre mais.

À Renorbio pela oportunidade de poder alcançar esse objetivo.

A todos os professores e colegas do ponto focal Alagoas, e dos demais pontos focais por compartilharem comigo os desafios durante o transcorrer do curso.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	IV
LISTA DE TABELAS .....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	XI
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1 A goiaba - <i>Psidium guajava</i> L. 1753 .....	6
2.2 A Família Tephritidae e a espécie <i>A. fraterculus</i> WIED, 1830.....	7
2.3 Danos e formas de controle.....	11
2.4 Substratos dispersores de voláteis.....	22
2.5 A comunicação química entre os insetos.....	25
2.6 Extração por aeração – Coleta de compostos voláteis.....	27
2.7 CG X CG/TOF-EM.....	28
2.8 Composição química de extratos de frutos de goiaba – <i>Psidium guajava</i> . .....	29
2.9 Feromônio de espécies do gênero <i>Anastrepha</i> . .....	30
2.10 Bioensaios.....	34
3 REVISÃO PATENTÁRIA .....	39
4 OBJETIVO GERAL. ....	41
5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
6 MATERIAL E MÉTODOS .....	43
6.1 Obtenção de frutos e coleta de larvas de <i>A. fraterculus</i> .....	43
6.2 Obtenção das populações de <i>Anastrepha fraterculus</i> adultas.....	44
6.3 Manutenção das populações de adultos de <i>A. fraterculus</i> em laboratório. .....	46
6.4 Obtenção de extratos de frutos de Goiaba – <i>Psidium guajava</i> .....	46

6.5 Coleta dos constituintes voláteis liberados por machos de <i>A. fraterculus</i> em chamamento. ....	48
6.6 Análise dos extratos de machos de <i>A. fraterculus</i> em chamamento por GC x GC/TOF-MS. ....	49
6.7 Uso de biopolímero para microencapsulamento. ....	50
6.8 Bioensaios comportamentais em condições de laboratório. ....	51
6.9 Análises estatísticas. ....	55
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO. ....	57
Parte -1. ....	57
7.1 Composição química dos extratos de voláteis liberados por machos de <i>A. fraterculus</i> em chamamento e caracterização das populações estudadas. ....	57
Parte - 2. ....	65
7.2 Bioensaios em condições de laboratório. ....	65
7.2.1 Avaliação da preferência de fêmeas de <i>A. fraterculus</i> por extratos de frutos de goiaba em dois estágios de maturação. ....	65
7.2.2 Como a idade das fêmeas influencia na resposta para soluções dos compostos sintéticos? ....	66
7.2.3 Atratividade das soluções dos compostos sintéticos para fêmeas de <i>A. fraterculus</i> . ....	69
7.2.4 Influência da concentração dos compostos na atração de fêmeas de <i>A. fraterculus</i> . ....	70
7.2.5 Avaliação das respostas de fêmeas às misturas das soluções dos compostos. ....	72
7.2.6 Respostas de fêmeas de <i>A. fraterculus</i> em bioensaios utilizando biopolímero como substrato. ....	75
7 CONCLUSÕES. ....	78
8 PERSPECTIVAS. ....	80
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. ....	81

<b>10 APÊNDICES</b> .....	92
<b>10.1 APÊNDICE – A:</b> Fichas descritivas dos compostos sintéticos adquiridos e utilizados na obtenção de extratos e formulação de soluções para isolamento e identificação de voláteis e para a realização de bioensaios. .	92
<b>10.2 APÊNDICE – B:</b> Artigo publicado no <i>Florida Entomologist</i> – Dez/2013.....	94
<b>10.3 APÊNDICE – C:</b> Artigo publicado no <i>Florida Entomologist</i> – Set/2013 .....	95
<b>10.4 APÊNDICE – D:</b> Depósito de Pedido de Patente sobre formulação de compostos .....	96

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Frutos de Goiaba, em estágio verde e maduro.....	6
Figura 2 - Variedades e características de goiabas cultivadas no Brasil.....	7
Figura 3 - Macho e fêmea de <i>A. fraterculus</i> .....	9
Figura 4 - Ápices dos acúleos. a) <i>A. sororcula</i> ; b) <i>A. obliqua</i> ; c) <i>A. fraterculus</i> ; d) <i>A. zenilidae</i> ; e) <i>A. turpinae</i> .....	10
Figura 5 - Ciclo de vida das moscas-das-frutas. ....	11
Figura 6 - Fruto infestado danificado .....	12
Figura 7 a-b - Aplicação de inseticida em pomar comercial de manga com uso de pulverizador tracionado por trator (a), e em pomar de maçãs com atomizador costal motorizado (b). ....	13
Figura 8 a-b - Armadilhas tipo McPhail (a) e tipo Jackson (b), empregadas no monitoramento e controle de moscas-das-frutas em pomares. ....	14
Figura 9 - CeraTrap®, composto à base de proteína hidrolisada. ....	15
Figura 10 - Atrantes de moscas-das-frutas à base de proteína hidrolisada produzidos no Brasil.....	16
Figura 11 - Parasitoide <i>D. longicaudata</i> (Ashmead) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE).....	16
Figura 12 - Etapa de processo produtivo de <i>C. capitata</i> na biofábrica Moscamed .....	17
Figura 13 - Fruto ensacado para proteção contra moscas-das-frutas .....	18
Figura 15 - Sistema de tratamento hidrotérmico voltado à eliminação de ovos de moscas-das-frutas em mangas no México.....	21
Figura 15 - Etapa de monitoramento da temperatura no interior do fruto. ....	21
Figura 16 - Representação esquemática de dispersão controlada de voláteis a partir de uma matriz não biodegradável.....	23
Figura 17 - Representação esquemática de dispersão controlada de voláteis a partir de uma matriz biodegradável. ....	23
Figura 18 - Classificação dos semioquímicos. ....	26
Figura 19 - Desenho esquemático de um sistema de coleta de voláteis por aeração.....	28

Figura 20 - Esquema estrutural de cromatógrafo gasoso bidimensional - CG x CG. ....	29
Figura 21 - Compostos identificados nos extratos de frutos verdes e maduros de goiaba, variedade vermelha. ....	30
Figura 22 - Macho de <i>A. fraterculus</i> em atividade de chamamento expondo o epitélio retal. ....	31
Figura 23 - Casal de <i>A. fraterculus</i> em cópula.....	32
Figura 24 - Compostos identificados no feromônio de moscas-das frutas do gênero <i>Anastrepha</i> .....	33
Figura 25 - Representação esquemática de um túnel de vento empregado na realização de bioensaios comportamentais com insetos.....	35
Figura 26 - Representação esquemática de arenas empregadas em bioensaios com insetos voadores: (a) arena com apenas um único tratamento; (b) arena com dois tratamentos.....	36
Figura 27 - Etapas de pesquisa, elaboração e disposição de iscas para uso no controle de moscas-das-frutas. ....	38
Figura 28 – Caixas com frutos infestados por larvas de <i>A. fraterculus</i> . ....	43
Figura 29 - Localidades das quais foram provenientes os insetos utilizados para obtenção dos extratos e realização dos bioensaios. ....	44
Figura 30 – Gaiolas de criação contendo populações de <i>A. fraterculus</i> .....	45
Figura 31 - Casais de <i>A. fraterculus</i> em frutos para reprodução (a) e fêmea ovipositando em fruto (b). ....	45
Figura 32 - Aparato para coleta de voláteis de frutos de goiaba. (a) bomba de ar; (b) fluxômetro; (c) câmara de aeração; (d) trap contendo carvão ativo; (e) trap contendo material adsorvente; (f) temporizador.....	47
Figura 33 - Aparato para coleta de voláteis emitidos por machos de <i>A. fraterculus</i> . (a) bomba de ar; (b) fluxômetro; (c) câmara de aeração; (d) trap contendo carvão ativo; (e) trap contendo material adsorvente....	48
Figura 34 - Cromatógrafo GC x GC/TOF-MS LECO Pegasus 4D do Institute of Organic Chemistry of the Academy of Sciences of the Czech Republic. ....	49
Figura 35 - Unidade monomérica de quitosana.....	51
Figura 36 - Gaiola/arena empregada nos bioensaios de laboratório.....	55

Figura 37 – Cromatogramas bidimensionais representativos das análises dos extratos do feromônio liberado por machos de <i>A. fraterculus</i> oriundos de Alagoas (A) e Vacaria (B).....	58
Figura 38 – Estruturas químicas de compostos identificados em extratos de machos de <i>A. fraterculus</i> .....	59
Figura 39 – Estrutura química do $\alpha$ -Copaeno .....	60
Figura 40 - Comparação entre as áreas de abundância dos compostos voláteis coincidentes presentes nas misturas liberadas por machos de <i>A. fraterculus</i> em chamamento nas populações estudadas. ....	60
Figura 41 - Análise multivariada dos principais componentes do feromônio sexual dos machos de <i>A. fraterculus</i> das populações estudadas (AL 1-5, BEN 1-5, PEL 1-5, PIR 1-5, SJ1-5, VAC 1-5). As populações de Alagoas, Pelotas e Vacaria, compreendem de forma evidente grupos distintos. Já as populações de Piracicaba, São Joaquim e Bento Gonçalves resultam num grupo misto. ....	61
Figura 42 – Padrão de dispersão dos compostos identificados nos feromônios liberados por machos de <i>A. fraterculus</i> de populações de Bento Gonçalves, São Joaquim e Piracicaba das de Pelotas, Vacaria e Alagoas. Enquanto a linha horizontal distingue as populações de Alagoas, Vacaria, Piracicaba e São Joaquim, das populações de Bento Gonçalves e Pelotas.....	62
Figura 44 - Resposta de fêmeas acasaladas de <i>A. fraterculus</i> para extrato do fruto em diferentes estágios de maturação.t (p<0.05).....	65
Figura 43 - Resposta de fêmeas virgens de <i>A. fraterculus</i> para extrato do fruto em diferentes estágios de maturação.t (p<0.05).....	65
Figura 45 - Resposta de fêmeas virgens de <i>A. fraterculus</i> de diferentes idades para as soluções dos compostos sintéticos. ....	67
Figura 46 – Resposta de fêmeas acasaladas de <i>A. fraterculus</i> de diferentes idades para as soluções dos compostos sintéticos. ....	68
Figura 47 – Resposta de fêmeas virgens de <i>A. fraterculus</i> para as soluções dos compostos sintéticos e extrato do fruto verde.....	69
Figura 48 – Resposta de fêmeas acasaladas de <i>A. fraterculus</i> para as soluções dos compostos sintéticos e extrato do fruto verde. ....	70
Figura 49 - Resposta de fêmeas virgens de <i>A. fraterculus</i> de diferentes idades para a mistura M6 ((S)-(-)-limoneno, $\alpha$ -trans-cariofileno, $\alpha$ -copaeno, octanoato de etila) na concentração 0,1 $\mu$ L/mL).....	73
Figura 50 - Resposta de fêmeas acasaladas de <i>A. fraterculus</i> de diferentes idades para a mistura M6 ((S)-(-)-limoneno, $\alpha$ -trans-cariofileno, $\alpha$ -copaeno, octanoato de etila) na concentração 0,1 $\mu$ L/mL).....	73

**Figura 51- Respostas de atratividade, para fêmeas de *A. fraterculus*, de compostos microencapsulados em biopolímero: (S)-(-)-limoneno, (R)-(+)-limoneno, Octanoato de etila,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -*trans*-cariofileno e extratos de frutos verdes e maduros.....75**

**Figura 52- Resposta comportamental de fêmeas de *A. fraterculus* expostas a misturas: M1- (S)-limoneno; octanoato de etila;  $\alpha$ -copaeno e  $\alpha$ -*trans*-cariofileno e M2- (R)-limoneno; octanoato de etila;  $\alpha$ -copaeno e  $\alpha$ -*trans*-cariofileno. ....76**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 - Produtos exportados (frutas frescas) pelo Brasil e montante em US\$ milhões, em 2015/ 2016. ....</b>	<b>2</b>
<b>Tabela 2- Média percentual dos compostos voláteis identificados por CG x CG/TOF-EM presentes simultaneamente em extratos de machos de diferentes populações de <i>A. fraterculus</i> em chamamento. ....</b>	<b>58</b>
<b>Tabela 3- Resposta de atração de fêmeas virgens de <i>A. fraterculus</i> em diferentes idades para as soluções dos compostos sintéticos em diferentes concentrações e quando comparados ao tratamento com hexano.....</b>	<b>70</b>
<b>Tabela 4 - Resposta de atração de fêmeas acasaladas de <i>A. fraterculus</i> para as soluções dos compostos sintéticos em diferentes concentrações e quando comparados ao tratamento com hexano.....</b>	<b>71</b>
<b>Tabela 5 - Respostas de fêmeas virgens de <i>A. fraterculus</i> para as misturas das soluções dos compostos sintéticos.....</b>	<b>72</b>
<b>Tabela 6 - Respostas de fêmeas acasaladas de <i>A. fraterculus</i> para as misturas das soluções dos compostos sintéticos.....</b>	<b>73</b>

## RESUMO

As moscas-das-frutas da família Tephritidae são insetos fitófagos de ampla distribuição nos trópicos e que provocam perdas financeiras expressivas à fruticultura, decorrentes dos danos provocados por suas larvas ao infestarem os frutos, sejam estes de pomares domésticos ou comerciais. A espécie *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) é a praga de maior importância econômica dentro do gênero, e por esta razão, diversos grupos têm dedicado considerável montante de seus recursos financeiros e intelectuais para elucidar questões estratégicas sobre a biologia desses insetos. Um dos pontos chave dos estudos com *A. fraterculus* trata da existência de 8 diferentes morfotipos intraespecíficos, que devido ao isolamento geográfico dessas populações e de hábitos alimentares, conferem a estas populações características morfológicas e químicas, estas relacionadas à composição do feromônio sexual, distintas entre si. Além disto tem-se que os tefritídeos apresentam íntima relação com seus hospedeiros, o que reforça a necessidade de conduzir um estudo objetivando encontrar quais compostos químicos estão envolvidos nessa interação e quais aspectos adicionais devem ser considerados na elaboração de estratégias sustentáveis de monitoramento e controle. Este trabalho objetivou caracterizar quimicamente as populações de seis diferentes localidades, através de análises por cromatografia gasosa bidimensional acoplada à espectrometria de massas, avaliando-se o grau de isolamento dessas populações a partir das diferenças entre as composições dos voláteis liberados pelos insetos machos e, identificar quais soluções de compostos sintéticos presentes em extratos do fruto hospedeiro (goiaba), quais concentrações e quais combinações destes seriam eficazes em testes de atratividade com fêmeas virgens e acasaladas, de 9, 12 e 15 dias de idade. Os compostos, a exemplo do (*R*)-(+)-limoneno; octanoato de etila;  $\alpha$ -copaeno e  $\alpha$ -*trans*-cariofileno, foram testados em laboratório, além de ter sido proposta a utilização de um biopolímero, cuja finalidade é servir como substrato para uso com a formulação de iscas atraentes, em armadilhas. Utilizou-se extratos obtidos por aeração de frutos e de insetos para a identificação de suas composições e para a realização de bioensaios com fêmeas desta espécie, em arena de vidro. O estudo revelou que há diferenças significativas na composição química do feromônio liberado pelos machos entre as populações estudadas; que as fêmeas de *A. fraterculus* respondem a soluções individuais e misturas dos compostos sintéticos encontrados nos hospedeiros,

influenciadas por sua idade e status de acasalamento; e que o biopolímero utilizado apresentou potencial capacidade de dispersão sustentada dos compostos voláteis utilizados.

**Palavras-chave:** moscas-das-frutas, atratividade, biopolímero, semioquímicos.

## ABSTRACT

The fruit flies are phytophagous insects widely distributed in the tropics and cause significant financial losses to fruit growing due to the damage caused by their larvae when they infest the fruits, at domestic or commercial orchards. *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) is the pest of major economic importance within the genus, and for this reason several groups have developed studies to elucidate strategic questions about the biology of these insects. A important point of the studies with *A. fraterculus* deals with the existence of 8 different intraspecific morphotypes that, due to the geographic isolation of these populations and of feeding habits, confer to these populations morphological and chemical characteristics, related to the composition of the sexual pheromone, different features between them. In addition, the tephritids present an intimate relationship with their hosts, which reinforces the need to conduct a study aiming to find which chemical compounds are involved in this interaction and which additional aspects should be considered in the elaboration of sustainable monitoring and control strategies. The aim of this work was to characterize the populations of six different localities by means of two-dimensional gas chromatography coupled to mass spectrometry, evaluating the degree of isolation of these populations from the differences between volatile compositions released by male insects and identifying which solutions of synthetic compounds present in extracts of the host fruit (guava), which concentrations and which combinations of these would be effective in tests of attractiveness with virgin and mated females, 9, 12 and 15 days old. The compounds, for example (*R*)-(+)-limonene; ethyl octanoate;  $\alpha$ -copaene and  $\alpha$ -*trans*-caryophyllene, were tested in the laboratory, in addition to having been proposed the use of a biopolymer, whose purpose is to serve as a substrate for use with the formulation of attractive baits in traps. It was used extracts obtained by aeration of fruits and insects to identify their compositions and to perform bioassays with females of this species, in glass sand. The study revealed that there are significant differences in the chemical composition of the pheromone released by males among the studied populations; that *A. fraterculus* females respond to individual solutions and mixtures of synthetic compounds found in hosts, influenced by their age and mating status; and that the biopolymer used had potential for sustained dispersion of the volatile compounds used.

**Keywords:** fruit-flies, attractiveness, biopolymer. semiochemical

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil, devido às suas características geoclimáticas, figura entre os países de maior produção agrícola do mundo. Contribuem para isso, além da vasta extensão territorial, as características dos solos e o clima, o crescente aprimoramento tecnológico em muitas atividades e culturas.

O desenvolvimento tecnológico voltado às práticas agrícolas permite aos produtores elevar o grau de aproveitamento das áreas cultivadas, de modo que se obtenha maior rendimento das culturas. Além de se buscar a melhoria do padrão genético do que se cultiva, busca-se também resolver ou minimizar os problemas e danos decorrentes da presença de pragas nas culturas, uma vez que estas configuram uma das principais barreiras do comércio internacional de produtos agrícolas.

É sabido que a agricultura brasileira tem nos cereais, leguminosas e oleaginosas seu maior volume do que é produzido, bem como do que é exportado. Segundo o IBGE em 2016 a produção desse grupo de produtos atingiu cerca de 184 milhões de toneladas, em uma área cultivada de pouco mais de 57,1 milhões de hectares, sendo a soja o principal produto, não apenas no agronegócio como de toda a pauta de exportação brasileira, respondendo por mais de US\$ 19,3 bilhões em exportações (MDIC, 2017).

Entretanto, a fruticultura tem grande destaque na carteira de produtos voltados ao mercado doméstico e também, de forma bastante significativa para o mercado externo. A fruticultura é uma atividade de extrema importância para geração de renda e o desenvolvimento agrícola do Brasil. Segundo a Confederação Nacional da Agricultura e Agropecuária do Brasil (CNA, 2017), o segmento gera, aproximadamente, 5,6 milhões de empregos, em plantações que cobrem mais de 2 milhões de hectares distribuídos por vários polos de produção no país.

A produção brasileira de frutas com destinação ao consumo *in natura*, bem como para a indústria, voltada à produção de sucos, doces e geleias, entre outros alimentos, atingiu em 2016, aproximadamente 43,8 milhões de toneladas, a segunda

maior safra brasileira da história, embora tenha correspondido a cerca de 1% a menos do que em 2015, ano cuja produção de frutas no país foi recorde, com 44,3 milhões de toneladas. Dados do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços – MDIC, relativos às exportações, em 2016, o volume exportado atingiu 836 mil toneladas de frutos frescos, o que rendeu ao país US\$ 580,4 milhões (Tabela 1). A redução observada na produção foi atribuída principalmente às condições climáticas no período, porém, associa-se ainda outro motivo: as perdas provocadas por pragas, dentre elas as moscas-das-frutas da família Tephritidae, um dos principais fatores que contribuem para as perdas e danos às culturas, bem como para o mercado do agronegócio (CNA, 2017).

**Tabela 1 - Produtos exportados (frutas frescas) pelo Brasil e montante em US\$ milhões. em 2015/ 2016.**

<b>DISCRIMINAÇÃO</b>	<b>2016 (A)</b>	<b>2015 (B)</b>	<b>Var. % A/B</b>
Goiabas, mangas e mangostões frescos	180.331.420	184.934.119	-2,49
Melões frescos	148.741.470	154.298.760	-3,60
Limões e limas, frescos ou secos	89.932.214	78.600.751	14,42
Uvas frescas	65.255.130	72.306.951	-9,75
Mamões (papias) frescos	43.088.633	43.675.555	-1,34
Bananas frescas ou secas	21.036.383	24.916.992	-15,57
Maçãs frescas	18.152.666	40.646.356	-55,34
Laranjas frescas ou secas	12.316.635	8.904.160	38,32
Abacaxis frescos ou secos	1.598.083	1.023.310	56,17
<b>TOTAL (US\$ Milhões)</b>	<b>580.452.634</b>	<b>609.306.954</b>	<b>-0,95</b>

Fonte: MDIC

Em seu *Boletim de Inteligência* voltado à fruticultura, editado em outubro de 2015, o Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE, 2015) aponta que o montante de frutas produzido pelo Brasil o classifica na terceira posição entre os maiores produtores mundiais, atrás apenas da China e da Índia, respectivamente, o que mostra a relevância deste setor para a economia nacional.

O boletim destaca ainda quais são as frutas, por ordem de maior relevância no tocante às exportações brasileiras (em toneladas): melão, manga, limão e lima, banana, maçã, mamão, melancia e uva, responderam por mais de 95% das exportações em 2014, tendo ainda, laranja, abacate, abacaxi, figo, coco, caqui, goiaba, tangerina e ameixa, menores índices de participação, mas não menos

importantes, no contexto geral das exportações do país. Sobre os estados com maior participação nas exportações de frutas frescas ou secas, em 2014, sete estados são responsáveis por mais de 96% do total exportado: Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia, São Paulo, Pernambuco, Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

As culturas mais afetadas por tefritídeos no território brasileiro constituem representantes das famílias Myrtaceae, Sapotaceae e Anacardiaceae. E entre frutas cujos danos provocados por tefritídeos têm sido os de maior impacto, destacam-se a goiaba (*Psidium guajava* L. 1753), a manga (*Mangifera indica* L. 1753), a carambola (*Averrhoa carambola* L) e a maçã (*Malus domestica* Borkh, 1803). A família Myrtaceae é predominantemente encontrada na América tropical, além da Malásia e Austrália e tem elenco bastante diversificado, abrangendo cerca de 150 gêneros, os quais abrigam mais de 5.600 espécies. Destaca-se ainda por apresentar muitas espécies capazes de produzir óleos voláteis, muitos deles com importância medicinal e/ou de grande importância econômica (RAMASUBBU et al, 2016).

Além das consideráveis perdas econômicas decorrentes dos danos diretos e indiretos causados por estes insetos, os produtores dessas frutas também sofrem restrições fitossanitárias impostas pelos países importadores nas relações comerciais internacionais de frutos *in natura* (GODOY, PACHECO & MALAVASI, 2011). Tais restrições ou barreiras são motivadas pela conscientização dos consumidores desses países em relação aos riscos da presença de agrotóxicos, bem como por medidas de contenção à introdução de pragas e doenças carreáveis pelos produtos, nos seus destinos, tendo muitas de suas regras sido definidas em instâncias internacionais colegiadas.

A exemplo disto tem-se o Acordo sobre Aplicação de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias (Acordo SPS) – que regula a aplicação das medidas sanitárias e fitossanitárias no comércio multilateral. O Acordo legitima exceções ao livre comércio, as quais podem ser utilizadas pelos membros da Organização Mundial do Comércio - OMC, quando houver necessidade de proteger a vida e a saúde das pessoas, dos animais ou preservar os vegetais, desde que tais medidas não se constituam num meio de discriminação arbitrário, entre países de mesmas condições, ou numa restrição encoberta ao comércio internacional. Há ainda a Convenção Internacional para Proteção dos Vegetais (CIPV), que é um tratado internacional com o objetivo de

impedir a propagação e a introdução de pragas das plantas e dos produtos derivados, assim como promover medidas apropriadas para controlá-las. O Brasil aderiu à convenção em abril de 1929, em Roma, na Itália (BRASIL, 2017).

De modo geral, o manejo da mosca-das-frutas tem sido realizado através do emprego de inseticidas organofosforados pulverizados em cobertura, associados ao emprego de iscas tóxicas a partir da captura dos adultos em armadilhas de monitoramento. No entanto, devido à retirada de alguns destes inseticidas do mercado, a eficácia das pulverizações em cobertura tem sido limitada. Os novos inseticidas disponíveis não têm sido suficientemente eficazes, principalmente no controle das larvas presentes no interior dos frutos. Este fato tem obrigado os produtores a optar por outras estratégias de manejo, com destaque para o emprego de iscas tóxicas (MACHOTA JUNIOR et al, 2015).

Grandes mercados consumidores mundiais de frutas, dentre alguns deles, países que integram o continente europeu, há alguns anos têm adotado medidas voltadas à redução e restrição do uso de agrotóxicos nos cultivos locais. Além disso, têm sido empregadas diversas condutas fiscalizatórias com o intuito de impedir ou limitar a entrada no continente de produtos que não detenham certificação de práticas de cultivo sustentável, pautadas em estratégias que provoquem menores impactos ao meio ambiente e que tragam menos riscos à saúde de quem os consome, em decorrência da presença de agrotóxicos nesses alimentos (CBI, 2017).

Como alternativa à utilização de agrotóxicos aos níveis aplicados, tradicionalmente de forma excessiva, há o emprego de compostos químicos capazes de mediar interações intra ou interespecíficas, e que surgem como importante ferramenta de manejo e controle de pragas na agricultura, em especial a fruticultura. Esses compostos são chamados de Semioquímicos (Do grego *Semeion* = Sinais), termo proposto por Law e Regnier em 1971, para descrever as interações químicas existentes entre os organismos.

Muitos desses compostos atuam como atraentes de insetos, com vistas ao monitoramento da presença de insetos-praga nos pomares e o seu uso em armadilhas destinadas à eliminação dos mesmos, e têm sido cada vez mais difundidos e cogitados como estratégia promissora, segura e ecologicamente sustentável.

Compostos à base de proteína hidrolisada são amplamente empregados há bastante tempo, no entanto têm ação inespecífica e acabam atraindo e eliminando insetos diversos, inclusive os considerados benéficos (RODRIGUES et al, 2015)

Voláteis emitidos por fontes tais como iscas artificiais, têm potencial de competição com odores das plantas hospedeiras cumprindo papel efetivo na atração de moscas-das-frutas, e sugerem que diferentes atrativos combinados, como voláteis de frutos hospedeiros, atrativos proteicos, entre outros compostos, melhoram significativamente a atração desses insetos (GALDINO & RAGA, 2016), e quando associadas às informações de comportamento relativas à preferência de odores podem melhorar as estratégias de controle quando se comparando com a utilização de medidas tradicionais (REDDY et al, 2014).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA.

### 2.1 A goiaba - *Psidium guajava* L. 1753

A goiaba, *Psidium guajava* (MYRTALES: MYRTACEAE) (Figura 1), popularmente conhecida também como Araçá-das-almas, Araçá-goiaba, Araçá-guaçu, Araçá-mirim, Araçaíba, Araçauaçu, Goiaba-maçã, Goiabeira, Goiabeira-branca, Goiabeira-vermelha, Guaiaba, Guaiava, Guaiba, Guava, Guiaba, a depender da variedade e região geográfica, é um fruto do tipo baga, com polpa carnosa, cuja casca tem coloração verde, no estágio imaturo e quando madura pode apresentar as cores amarela ou roxa, polpa rosada ou variando entre o branco e o creme.

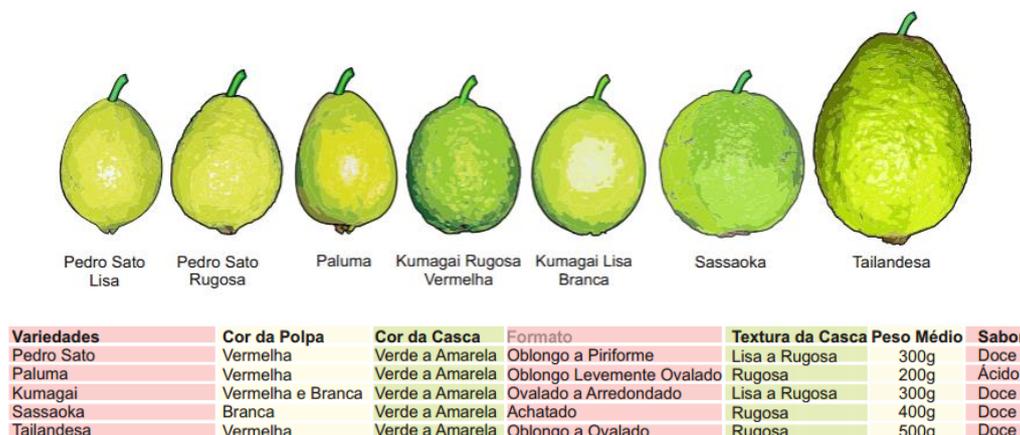
Figura 1 - Frutos de Goiaba, em estágio verde e maduro.



Foto: Agência de Notícias - Embrapa

A planta, originária da América tropical, é do tipo arbusto de pequeno-médio porte, atingindo entre 4 e 8 metros, e presente tipicamente em regiões de clima tropical, estando atualmente também bastante disseminada no sudeste da Ásia. As variedades cultivadas no Brasil (Figura 2) se diferenciam de acordo com a finalidade de uso, variando com o destino da fruta, que pode ser para o mercado de consumo *in natura* ou indústria. Para cada segmento existem preferências do tipo de fruta quanto ao formato, cor da polpa, tamanho, cor da casca e características físico-químicas específicas. A variedade mais cultivada é 'Paluma', que atende bem tanto aos consumidores da fruta fresca como da indústria. Outras variedades cultivadas são: Pedro Sato, Kumagai, Rica, Cortibel, Ogawa, Sassaoka e Tailandesa (FLORI, 2016).

**Figura 2 - Variedades e características de goiabas cultivadas no Brasil.**



Adaptado de: <http://www.sabedoriaglobal.com.br/como-plantar-goiaba/>

## 2.2 A Família Tephritidae e a espécie *A. fraterculus* WIED, 1830.

A família Tephritidae abrange um amplo grupo de insetos dos quais grande parte destes é considerada praga na fruticultura mundial. As moscas-das-frutas que compreendem esta família apresentam grande diversidade no mundo, alcançando mais de 4.300 espécies, distribuídas em quase 500 gêneros amplamente distribuídos principalmente na região intertropical (NORRBOM & KORYTKOWSKI, 2012; SILVA & BATISTA, 2015). A família tem aspecto cosmopolita, sendo sua distribuição limitada pela disponibilidade de hospedeiros e por condições climáticas extremas.

O combate a esses insetos tem sido uma das prioridades da defesa agropecuária, visto que constituem, atualmente, a principal barreira sanitária ao avanço das exportações brasileiras do setor de fruticultura. Seis estados têm recebido atenção especial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no desenvolvimento de ações de combate às moscas das frutas: Santa Catarina, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Essas unidades da Federação são exportadoras de maçã, melão, manga, melancia e uva (RANGEL, 2016).

As moscas-das-frutas desta família são responsáveis por perdas de até 100% da produção em áreas onde ocorrem altas infestações, ocasionando danos mundiais na ordem de US\$ 1 bilhão (CARVALHO, 2006; SILVA & BATISTA, 2015, HENDRICHS

et al, 2015). Seis gêneros desta família apresentam relevância como pragas na agricultura mundial: *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Dacus*, *Rhagoletis* e *Toxotrypana* (MALAVASI et al., 2000). Destes, quatro têm espécies que no Brasil afetam culturas - *Anastrepha*, *Bactrocera* (*Bactrocera carambolae* DREW & HANCOCK), *Ceratitis* (*Ceratitis capitata* WIEDEMANN) e *Rhagoletis* (ZUCCHI, 2000a).

O gênero *Anastrepha* é o que apresenta maior número de espécies. Na América tropical e subtropical com ocorrência no Brasil, totaliza 121 espécies, descritas infestando mais de 200 espécies de plantas pertencentes a 44 famílias de vegetais, sendo no Brasil, Myrtaceae, Sapotaceae e Anacardiaceae, as mais afetadas pelas moscas do gênero, com 53, 20 e 15 espécies, respectivamente (ESALQ, 2017). Pelo menos sete espécies de *Anastrepha* são consideradas importantes pragas agrícolas de relevância econômica devido à grande importância do cultivo frutos que atacam e sua ampla gama de hospedeiros. Essas sete espécies são *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann); *Anastrepha grandis* (Macquart); *Anastrepha ludens* (Loew); *Anastrepha obliqua* (Macquart); *Anastrepha serpentina* (Wiedemann); *Anastrepha striata* Schiner; e *Anastrepha suspensa* (Loew). *A. fraterculus* foi reconhecida de fato como um complexo de espécies crípticas (CÁCERES et al., 2009; HERNÁNDEZ-ORTIZ et al, 2012; SELIVON et al, 2004, 2005).

Na América Latina a espécie *A. fraterculus* (DIPTERA: TEPHRITIDAE), também conhecida como mosca-das-frutas Sul-americana, compreende um complexo de oito morfotipos, com regiões geográficas e ecológicas definidas, que podem ser considerados como espécies distintas biologicamente com base nas diferenças dos cariótipos, na incompatibilidade sexual e nas análises moleculares dos hidrocarbonetos cuticulares e do feromônio (HERNÁNDEZ-ORTIZ, 2012; HERNÁNDEZ-ORTIZ, 2015; HENDRICH, 2015). É a principal espécie de moscas-das-frutas encontrada no país, infestando 114 hospedeiros distintos, em 23 dos 26 estados brasileiros (ESALQ, 2017).

O Brasil possui a maior variedade de espécies do complexo *A. fraterculus* (complexo AF), onde pelo menos três morfotipos já foram identificados em diferentes regiões geográficas, denominadas *Anastrepha* sp.1 aff. *fraterculus*, *Anastrepha* sp.2 aff. *fraterculus* e *Anastrepha* sp.3 aff. *Fraterculus*, cuja caracterização foi devido à

análise combinada de isoenzimas, de cariótipos, morfologia dos ovos e morfometria dos indivíduos (SELIVON et al, 1999; SELIVON et al 2004, SELIVON et al, 2005).

Os adultos da mosca-das-frutas Sul Americana possuem corpo com coloração amarela com asas transparentes, apresentando duas manchas características, uma em forma de “S” na parte central e uma em “V” invertido no ápice. Os adultos medem cerca de 7 mm de comprimento e 16 mm de envergadura. As fêmeas diferem dos machos por possuírem uma parte que vai da margem posterior da cloaca até a extremidade final do acúleo (Figura 3) que é chamada de ápice do acúleo, principal estrutura/característica para a identificação da espécie de mosca-das-frutas (MONTES, RAGA, SOUZA-FILHO; 2013)

**Figura 3 - Macho e fêmea de *A. fraterculus***

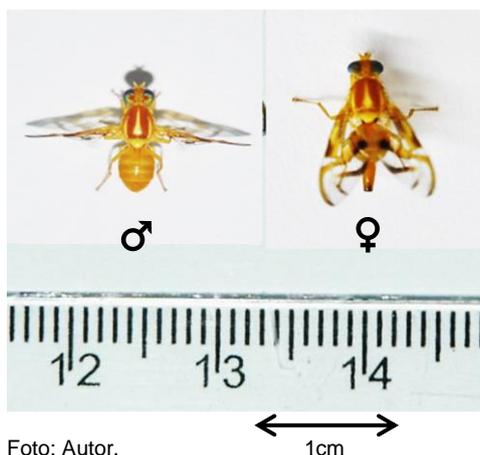
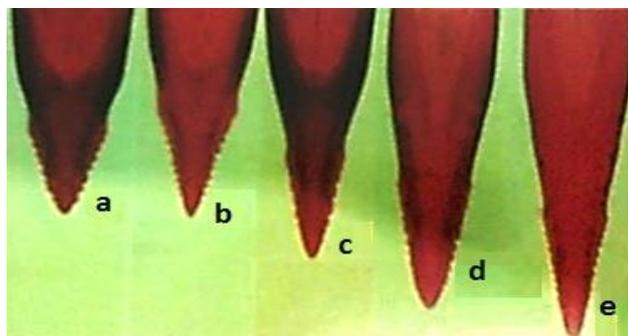


Foto: Autor.

1cm

Salvo algumas exceções, a identificação segura só pode ser baseada nas fêmeas em decorrência do acúleo (Figura 4). Neste caso, a identificação leva em conta dimensões e forma da parte serrilhada dos acúleos, o que exige elevado grau de perícia e conhecimento para quem vai realizar a identificação (ZUCCHI, 2000a).

**Figura 4 - Ápices dos acúleos. a) *A. sororcula*; b) *A. obliqua*; c) *A. fraterculus*; d) *A. zenilidae*; e) *A. turpinae*.**



Fonte: Adaptado de Zucchi, 2000.

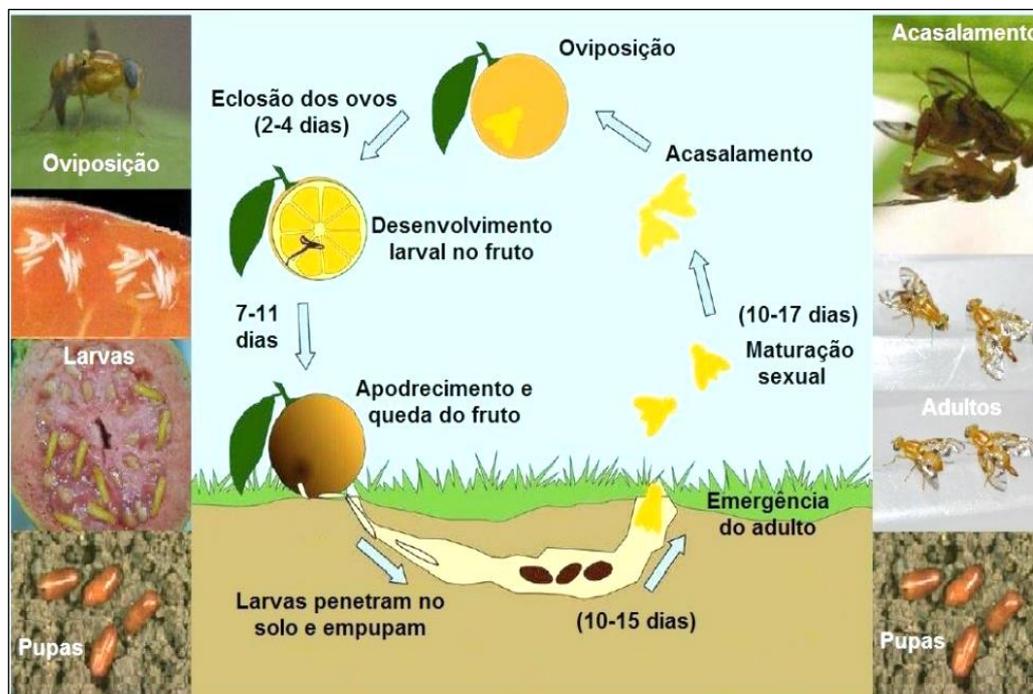
As moscas-das-frutas são insetos de metamorfose completa passando pelos estágios de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 5). As fêmeas da mosca-das-frutas após a emergência necessitam ingerir alimentos proteicos, levando de quatro a sete dias para atingir a maturidade sexual (MORGANTE et al., 1983). Salles (2000) indica que o período de pré-oviposição varia entre sete a trinta dias e a postura ocorre exclusivamente em frutas. As fêmeas, segundo BISOGNIN e colaboradores (2013), quando aos 15 dias de idade, apresentam a maior capacidade para a postura de ovos.

A oviposição é também influenciada, além da idade, pela temperatura, pela luminosidade e por características do fruto (forma, tamanho, propriedades da casca) e pelo estágio de maturação dos frutos (AZEVEDO et al, 2013; BISOGNIN et al, 2013). As fêmeas depositam vários ovos no interior do fruto com auxílio do acúleo (ovipositor) exatamente na polpa, logo abaixo da epiderme, e embora as fêmeas marquem o fruto com feromônio após a oviposição, várias fêmeas podem ovipositar no mesmo fruto. Após três dias, aproximadamente, ocorre a eclosão das larvas que passam por três estágios. As larvas são do tipo vermiforme e de cor branca a branco-amarelada, com o corpo liso (SILVA & BATISTA, 2015).

Dentro do fruto, fazem da polpa sua fonte de alimento produzindo galerias no interior dos frutos (MALAVASI, 2009). A duração da fase larval varia de acordo com a temperatura, podendo ser de 34,5 dias sob temperatura de 15°C, a 14 dias sob temperatura de 30°C, não ocorrendo o desenvolvimento em temperaturas inferiores a 10 °C e superiores a 35 °C (SALLES, 2000). Ao final da fase de larva, essas saem dos

frutos e empupam no solo na camada que vai de 2 a 6 cm de profundidade (SALLES & CARVALHO, 1993).

**Figura 5 - Ciclo de vida das moscas-das-frutas.**



Fonte: Adaptado de KAMIYA, 2010.

Os adultos emergem após um período médio variável entre 13 e 39 dias quando submetidos a temperaturas médias que oscilam entre 30°C e 17,5 °C, respectivamente<sup>1</sup>. Os machos normalmente permanecem pousados na folhagem periférica ao fruto, atraindo as fêmeas para o acasalamento por meio de movimentos, emissão de sons e liberação de feromônio sexual. Uma vez que a fêmea esteja apta, ocorre o acasalamento (BISOGNIN et al, 2013).

## 2.3 Danos e formas de controle.

Para os países com a presença das moscas-das-frutas a perda parcial ou total da produção ocorre devido à postura dos ovos pelas fêmeas e à presença das larvas em seu fruto hospedeiro (Figura 6), provocando danos diretos e indiretos. Carvalho (2006), corroborado por estudos realizados por Nondillo e colaboradores (2010), os

<sup>1</sup> Temperaturas mais elevadas favorecem para que o ciclo de desenvolvimento do inseto se complete em menores períodos de tempo.

quais avaliaram os danos em morangos decorrentes da infestação de *Frankliniella occidentalis* (THYSANOPTERA: THRIPIDAE), caracterizou os danos diretos aos frutos como os decorrentes da oviposição das fêmeas dos insetos e o consumo da polpa pela larva, onde o efeito da atividade enzimática da microbiota bacteriana específica do inseto apodrece os frutos e provoca a queda precoce dos mesmos. Já os danos ditos indiretos são causados por infecções secundárias causadas por fungos e bactérias que se utilizam, de maneira oportunista, das aberturas feitas pelo ovipositor da mosca para acessarem o interior dos frutos e se desenvolverem, tornando-os imprestáveis para consumo *in natura* ou para o processamento industrial.

**Figura 6 - Fruto infestado danificado**



Foto: Autor

O êxito no manejo das moscas-das-frutas deve se basear na integração de vários métodos de controle, uma vez que essas espécies apresentam características que as distinguem como pragas-chave, como a alta produção e viabilidade de ovos, grande capacidade de dispersão de adultos e de colonização em diferentes condições ecológicas (RAGA & SOUZA-FILHO, 2016). Este conceito de controle de insetos-praga é um dos pilares do Manejo Integrado de Pragas – MIP que deve resultar na associação harmônica de diferentes métodos de controle: biológico, químico, cultural e genético (BRAGA SOBRINHO et al., 2001).

Dentro da estratégia do MIP, o monitoramento das áreas cultivadas consiste em uma das etapas mais relevantes, uma vez que sinaliza a ocorrência de determinada espécie na área ou o aumento do nível populacional de uma ou mais pragas em áreas de cultivo, possibilitando a adoção precoce e/ou oportuna de

medidas. Essas medidas são precedidas de etapas entre as quais se destacam: pesquisa científica – identificação e distribuição de espécies; certificação de uma região ou país quanto à ausência de uma determinada espécie-praga – área livre; programa de erradicação de uma espécie-praga; programa de manejo integrado. A eficiência do monitoramento de adultos de moscas-das-frutas está comumente na dependência da qualidade do atrativo (alimentar ou sexual), do tipo de armadilha utilizada e de sua localização no campo (NASCIMENTO & CARVALHO, 2000). Recentemente, tecnologias de vanguarda têm sinalizado aos produtores, mecanismos de identificação automatizada de insetos. Contudo, este ainda não é um cenário considerado estabelecido em vista de aplicações econômicas e práticas adotadas por produtores (POTAMITIS, 2017)

De acordo com Malavasi (2009) e Silva & Batista (2015), os Programas de Controle de Moscas-das-frutas se valem atualmente dos seguintes métodos para o controle:

Controle Químico por Pulverização: Consiste na aplicação de inseticidas através de equipamentos pulverizadores ou atomizadores (Figura 7a-b). Entre os produtos empregados tem-se o Spinosad (espinosina), além do organofosforado malathion, que embora ainda seja usado, tende a ser gradualmente substituído pelas iscas inseticidas. A aplicação pode ser terrestre através de pulverizadores costais ou de grande capacidade, tracionados por trator, ou aérea através de aviões com capacidade variando entre 300 e 2000 litros.

**Figura 7 a-b - Aplicação de inseticida em pomar comercial de manga com uso de pulverizador tracionado por trator (a), e em pomar de maçãs com atomizador costal motorizado (b).**



(a)



(b) (Foto: STIHL®)

Isclas tóxicas com atrativo sexual ou alimentar: associa-se um atrativo sexual, como por exemplo o metil-eugenol, ou alimentar a exemplo de sucos de frutas e proteína hidrolisada juntamente com inseticida para atração dos machos que após ingerirem a mistura morrem em poucos minutos. A mistura atrativo-inseticida pode ser aplicada com bomba acionada com ar comprimido associada com um agente aderente ou aplicada em algum substrato como blocos de madeira ou à base de polímeros, os quais são distribuídos no ambiente, em geral associados aos hospedeiros. Isclas tóxicas com atrativo alimentar são empregadas atualmente com uso também do Spinosad.

A aplicação de iscla tóxica em armadilhas (Figura 8 a-b), em ruas alternadas ou a cada cinco ruas do pomar, é um modo de diminuir os efeitos nocivos dos inseticidas, pois não sendo aplicada em área total, pode reduzir a probabilidade de matar insetos benéficos (abelhas polinizadoras, predadores e parasitoides) por contato. Entretanto, alguns insetos benéficos e outras pragas não alvo podem ser atraídos para se alimentar da proteína hidrolisada presente na iscla tóxica e serem eliminados. Também como efeito indireto, os inimigos naturais ao se alimentarem das pragas intoxicadas com a iscla tóxica podem ter a longevidade e/ou fecundidade afetadas (PARANHOS, 2008).

**Figura 8 a-b - Armadilhas tipo McPhail (a) e tipo Jackson (b), empregadas no monitoramento e controle de moscas-das-frutas em pomares.**



(a)



(b)

Há cerca de seis anos, um composto atraente para moscas formulado à base de proteína hidrolisada – obtida a partir de uma hidrólise enzimática da mucosa intestinal de suínos – adicionada de acetato de amônio, bórax e metabissulfito de

sódio foi lançado pela empresa espanhola *Biolbérica* chamado CeraTrap® (Figura 9). Devido à estabilidade apresentada pela formulação cuja atratividade aos adultos mostrou-se mantida por um período de até 60 dias, a captura massal enquadra-se como objeto de estudos para o controle da mosca-das-frutas sul-americana (MACHOTA JUNIOR et al, 2013). Outro estudo conduzido por CARVALHO e colaboradores (2016) demonstrou que o produto também se mostrou com maior eficácia na atração de *B. Carambolae* quando comparado à levedura *Torula*, considerada padrão mundial para o monitoramento de tefritídeos, assim como na atração de *Ceratitís Capitata* em atividade de coleta massal durante experimentos realizados em pomares para o monitoramento de moscas-das-frutas (COSTA et al, 2016).

**Figura 9 - CeraTrap®, composto à base de proteína hidrolisada.**



Fonte: Biolherica

No Brasil destacam-se ainda os produtos Bio *Anastrepha*® e Bio Fruit® (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** Figura 10a) formulados pela empresa BioControle formulados à base de proteína hidrolisada, voltados ao controle de moscas do gênero *Anastrepha* e da espécie *C. capitata*.

**Figura 10 - Atraentes de moscas-das-frutas à base de proteína hidrolisada produzidos no Brasil.**



Fonte: BioControle.

Controle Biológico: Para o controle biológico de moscas-das-frutas podem ser empregados agentes patogênicos tais como fungos (ex. *Metarhizium anisopliae*) e bactérias (ex. *Bacillus thuringiensis*) ou outros inimigos naturais: parasitoides - pertencentes principalmente às famílias Braconidae e Figitidae; nematoides (*Steinernema riobrave*) e predadores (joaninhas). Entre os parasitoides, na primeira família destacam-se espécies dos gêneros *Doryctobracon*, *Opius* e *Utetes*, e na segunda família, espécies dos gêneros *Aganaspis*, *Odontosema*, *Tropideucoila*, *Dicerataspis* e *Lopheucoila*. *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) (Figura 11), um parasitoide específico de moscas Tephritidae e originário da região asiática e que foi introduzido no Brasil em 1994, através de iniciativa da Embrapa - Mandioca e Fruticultura, sendo liberado em áreas-piloto do Nordeste para controlar tefritídeos. Trata-se de uma vespa que ao localizar a larva da mosca no interior do fruto, introduz seu ovipositor através da casca e deposita um ovo no interior desta larva. Quando a larva da mosca passa ao estágio de pupa, a larva da vespa eclode do ovo e começa a se alimentar da pupa da mosca, matando-a antes que se desenvolva à fase adulta (SILVA & BATISTA, 2015).

**Figura 11 - Parasitoide *D. longicaudata* (Ashmead) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)**



Foto: Autor não identificado

Técnica do Inseto Estéril (TIE): A TIE consiste na liberação de um grande número de machos estéreis no ambiente de modo que estes copulem com as fêmeas da natureza (selvagens), transferindo espermatozoides inviáveis. O resultado é a não fecundação dos óvulos das fêmeas e a conseqüente redução populacional da praga no campo. Aplicada por certo período de tempo – meses ou anos – a TIE é usada em programas de erradicação, de supressão ou ainda de prevenção da ocorrência de insetos-praga e até mesmo insetos de interesse médico

Em 2005 foi fundada na Bahia a MOSCAMED – BRASIL<sup>®</sup>, a primeira biofábrica do mundo escolhida pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA) a utilizar a tecnologia de raios-x para a esterilização de insetos. Suas atividades são voltadas para a produção de insetos empregados no manejo integrado de moscas-das-frutas, no monitoramento de espécies de interesse econômico, em especial a *C. capitata*, e na capacitação, treinamento e disseminação de informação técnico-científica.

No processo de produção em escala industrial os ovos coletados são submetidos à temperatura de 34 °C durante 24h, eliminando ovos que dariam origem às fêmeas. Em seguida, os ovos são inoculados em dieta artificial, que simula a polpa da fruta. As moscas completam seu estágio de maturação e passam à fase de pupa. Nessa fase, entre 48 e 24 horas antes da emergência dos adultos, as pupas são pintadas com tinta em pó fluorescente, ensacadas e irradiadas com Raios-X, finalizando-se o processo, estando os machos estéreis (pupas) aptos a serem liberados em campo (PARANHOS, 2007).

**Figura 12 - Etapa de processo produtivo de *C. capitata* na biofábrica Moscamed**



A estratégia inovadora da TIE também levou a MOSCAMED – BRASIL a atuar como membro de um projeto de produção e liberação de machos de *Aedes aegypti* no Brasil a partir de 2016. A perspectiva do projeto é de empregar a técnica do inseto estéril para suprimir a população das fêmeas do mosquito transmissor da dengue, zika e chikungunya com vistas a reduzir a ocorrência dessas doenças na população (EBC-AGÊNCIA BRASIL, 2016).

Métodos Culturais: remoção de frutas (os frutos maduros e caídos no solo devem ser retirados e destruídos para impedir a emergência e reprodução das moscas); e eliminação das plantas hospedeiras e que não sejam destinadas à comercialização. Outro método cultural consiste no ensacamento dos frutos ainda na fase inicial do desenvolvimento (Figura 13). Esta técnica consiste em bloquear o acesso das fêmeas aos frutos, impedindo-as de ovipositarem nestes.

**Figura 13 - Fruto ensacado para proteção contra moscas-das-frutas**



Foto: André Fortes

Medidas Quarentenárias: A despeito de todas as estratégias adotadas para se controlar a ocorrência e os danos provocados pelas moscas-das-frutas, tem-se observado que diversos países buscam regulamentar sanções e medidas que visem responsabilizar quem lida com o cultivo e o comércio de frutas susceptíveis à ação de tefritídeos. Tais regras podem ser definidas por um determinado país ou grupos de

estados, podendo defini-las de forma colegiada entre os parceiros com os quais são estabelecidas as relações comerciais.

No Brasil, o estado da Bahia foi pioneiro na adoção de medidas legislativas para o controle das moscas-das-frutas mediante a publicação através da Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB) (AGUIAR, 2012). Isso se institucionalizou a partir da publicação da Portaria Estadual nº 194 de 19 de dezembro de 2001, que determinava a obrigatoriedade e rígido controle de moscas-das-frutas tanto em pomares oficialmente inseridos no Programa Estadual de Controle da praga como no restante das propriedades produtoras de frutas hospedeiras de moscas-das-frutas, adotando-se as medidas de supressão populacional pré-estabelecidas no referido programa.

Ainda na Bahia, a Lei estadual 10.434 de 22 de dezembro de 2006, que foi regulamentada pelo Decreto nº 11.414, de 27 de janeiro de 2009 nos quais estão estabelecidas sanções administrativas, dentre as quais enquadram-se multas aos produtores que não adotarem medidas de sanidade às culturas. Nessa lei estão previstas ainda, para os fruticultores que vierem a infringi-la, penalidades que os enquadram no Art. 259<sup>2</sup> do Código Penal Brasileiro (BRASIL, 1940).

Entretanto, é inócuo crer que apenas medidas legais sejam suficientes para se controlar infestações por moscas-da-frutas, ou ainda impedir que sejam introduzidas em áreas livres. A exemplo de ações complementares, descrevem-se os processos de tratamento pós-colheita – tratamento hidrotérmico e radiação ionizante, por exemplo – empregados com o objetivo de eliminar do interior dos frutos, larvas e demais organismos oportunistas.

De modo a institucionalizar como política nacional as ações de monitoramento e controle das moscas-das-frutas no país, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento publicou em 2015 a Instrução Normativa Nº 24, instituindo o Programa

---

<sup>2</sup> Art. 259 - Difundir doença ou praga que possa causar dano a floresta, plantação ou animais de utilidade econômica: **Pena** - reclusão, de dois a cinco anos, e multa.

Nacional de Combate às Moscas-das-Frutas - PNMF, que abrange quatro subprogramas:

- ✓ subprograma de *B. carambolae*;
- ✓ subprograma de *Anastrepha* contemplando as espécies de *A. grandis*, *A. fraterculus* e *A. obliqua*.
- ✓ subprograma de *Ceratitidis capitata*;
- ✓ subprograma para outras moscas-das-frutas de importância econômica e quarentenária;

E que se pauta na adoção das seguintes medidas e estratégias:

- I - vigilância por meio de levantamentos e monitoramentos fitossanitários;*
- II - prevenção, controle e erradicação de pragas;*
- III - estabelecimento e manutenção de Áreas Livres de Pragas;*
- IV - estabelecimento e manutenção de Áreas de Baixa Prevalência de Pragas;*
- V - aplicação de Medidas Integradas em um Enfoque de Sistema para Manejo de Risco de Pragas;*
- VI - implementação de Planos de Contingência para pragas quarentenárias;*
- VII - estabelecimento e manutenção de Áreas de Proteção Fitossanitária;*
- VIII - controle de trânsito de vegetais;*
- IX - criação de Grupos de Emergência Fitossanitária para pragas quarentenárias;*
- X - definição e proposição de linhas de pesquisa; e*
- XI - outros mecanismos estabelecidos em acordos internacionais.*

Complementarmente às ações e estratégias descritas devem ser previstas atividades e projetos de educação fitossanitária. Essas ações de capacitação e treinamento no âmbito do Programa deverão alcançar os fiscais federais agropecuários, os fiscais e agentes de defesa agropecuária estaduais, os responsáveis técnicos, os produtores rurais e os demais agentes envolvidos.

Tratamento hidrotérmico: Esta técnica é utilizada após a colheita dos frutos e tem sido bastante empregada como estratégia para eliminação das larvas de moscas-das-frutas que infestam mangas destinadas à exportação, em especial, a alguns países que exigem este tipo de manejo, como forma de impedir a entrada de tefritídeos em seus territórios.

A técnica tem como finalidade matar ovos e/ou larvas que porventura estejam dentro dos frutos. Segundo as exigências dos EUA para frutos de manga provenientes do México, para as variedades Haden, Kent, Keitt ou Tommy Atkins, a fruta deve permanecer imersa em água com temperatura igual ou superior a 46,1 °C ( $\pm 1$  °C) (Figura 15), em intervalos de tempo que variam entre 75 minutos e 110 minutos, conforme o peso dos frutos, os quais já devem ter sido previamente selecionados, mediante processo automatizado. A temperatura da polpa do fruto deve ser de pelo menos 45 °C (Figura 15) e o hidroarrefecimento ou outros métodos de arrefecimento rápido podem ser utilizados logo após o término do tratamento (GARCIA, 2013).

Já para o Japão, as exigências são para que os frutos sejam submersos em água a uma temperatura de 47 °C até que atinjam a temperatura de 46 °C próximo ao caroço, devendo então permanecerem por 5 minutos. Quanto maior o fruto, maior deverá ser o tempo de tratamento, normalmente variando entre 80 a 95 minutos.

**Figura 15 - Sistema de tratamento hidrotérmico voltado à eliminação de ovos de moscas-das-frutas em mangas no México.**



**Figura 15 - Etapa de monitoramento da temperatura no interior do fruto.**



Fonte: Extraído de [www.mango.org/research](http://www.mango.org/research)

De acordo com o Plano de Trabalho para o Tratamento Hidrotérmico da Manga Brasileira e o Programa de Exportação, o nível Mosca/Armadilha/Dia (MAD) atual que determina o início do controle obrigatório, é 0,5 para moscas-das-frutas em armadilhas tipo *Jackson* (PARANHOS et al, 2004).

Além de aspectos relativos às potenciais alterações nos frutos (coloração, ritmo de amadurecimento, firmeza da polpa) decorrentes da exposição excessiva ao tratamento térmico (GARCIA, 2016), os custos efetivos relacionados às atividades inerentes a execução do monitoramento das moscas-das-frutas no Polo Frutícola do Vale do Rio Brumado (BA) representam 1,4 % do custo total de produção da cultura da manga no período de um ano, enquanto que aliado às atividades de controle preconizadas para esta praga, esse custo sobe para 7,8 % do custo de produção para a mesma cultura e no referido Polo Frutícola (AGUIAR & NASCIMENTO, 2011).

## **2.4 Substratos dispersores de voláteis**

Dentre as metodologias empregadas no manejo de pragas, as que se utilizam de compostos químicos atraentes aos insetos e que os desviam dos frutos alvo e os levam ao contato com inseticidas ou armadilhas para sua eliminação têm sido objetivo de aprofundados estudos por parte de diversos grupos de pesquisa (NANDAGOPAL et al, 2015).

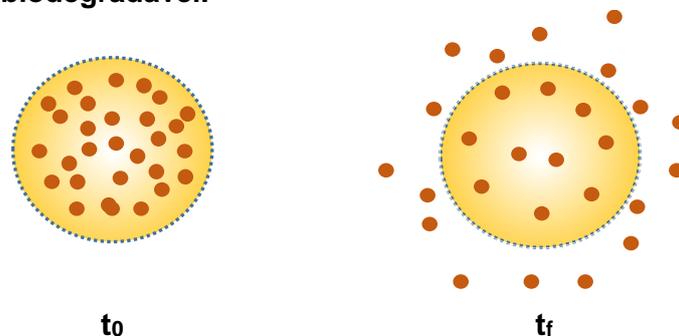
A busca por produtos que sejam, concomitantemente, eficazes no que concerne à eliminação e seletivos às espécies alvo, tem sido um dos principais objetivos neste tipo de pesquisa. Porém, há que se considerar que em virtude da volatilidade da grande maioria dos compostos empregados, faz-se necessário que os locais ou estruturas onde são depositados esses compostos atraentes sejam capazes de promover a dispersão dos mesmos pelo máximo de tempo possível, de modo que o intervalo para a reposição da carga do atraente seja ampliado ao máximo possível. Entre os produtos atualmente utilizados como matriz para uso como dispersores de voláteis, nas mais diversas aplicações estão a madeira, a borracha e polímeros sintéticos.

Nesse contexto, e observando-se a aplicação como uma metodologia voltada à atração de insetos no campo, é essencial que sejam desenvolvidos produtos, processos e estratégias capazes de promover uma liberação efetiva e controlada dos compostos para se manter a taxa de evaporação dos emissores de fontes pontuais em níveis adequados de resposta dos insetos durante toda a época de acasalamento (STIPANOVIC et al, 2004).

Durante as duas últimas décadas, avanços significativos foram alcançados no desenvolvimento de materiais biocompatíveis e biodegradáveis para aplicações biomédicas, e no caso da última categoria, também em aplicações industriais. Tipicamente, inorgânicos (metais, cerâmicas) e poliméricos (sintéticos e naturais) os materiais têm sido usados no desenvolvimento de itens como válvulas cardíacas artificiais, veias e artérias, adesivos médicos, suturas, compósitos dentários, e polímeros para liberação controlada e lenta de fármacos ou outros produtos (Figura 16). O desenvolvimento de novos materiais biocompatíveis inclui características que vão além da não toxicidade à bioatividade em relação à interação com, e, ao tempo (NANDAGOPAL et al, 2015).

As vantagens dos polímeros para este propósito são consideráveis: a matriz polimérica desaparece (Figura 17) de forma inócua com o passar do tempo; a degradação pode ser adaptada ao exigido para o produto a ser utilizado (fármaco ou inseticida), variando a composição do copolímero.

**Figura 16 - Representação esquemática de dispersão controlada de voláteis a partir de uma matriz não biodegradável.**



**Figura 17 - Representação esquemática de dispersão controlada de voláteis a partir de uma matriz biodegradável.**



Entre os biopolímeros atualmente utilizados, nas mais diversas áreas, a quitosana tem apresentado resultados promissores em aplicações farmacêuticas. A quitosana pode ser obtida a partir da quitina por meio da desacetilação com álcalis, podendo também estar naturalmente presente em alguns fungos (SILVA et al, 2006)

Segundo STIPANOVIC e colaboradores (2004), embora eficazes em muitos casos, esses dispositivos sofrem de várias limitações inerentes:

(1) Dependendo do dispositivo e da formulação, as taxas de liberação podem variar com o tempo. A chamada cinética de lançamento de "ordem zero", onde a taxa de evaporação é independente do tempo, é a mais desejável.

(2) Para a maioria dos dispersores de feromônios, a concentração do ingrediente ativo no ar cai muito rapidamente com a distância do dispositivo, e eles são apenas relativamente efetivos à atração e ao aprisionamento dos insetos.

(3) Certos dispositivos podem ter custos elevados ou complexos de serem produzidos, exigindo-se considerável tempo e estrutura para serem fabricados e portanto podem não ser possível a produção em larga escala.

(4) A implementação da estratégia no campo pode exigir uma intensiva mão-de-obra, caso os dispositivos individuais tenham de ser fixados manualmente às árvores, de modo que se atinja a região superior da mesma, onde muitos feromônios são mais eficazes.

(5) O dispositivo polimérico dito empacotado ou revestido geralmente não é biodegradável e pode se acumular no ambiente.

Abordagens alternativas envolveram o uso de microcápsulas ou esferas de plástico cheias ou saturadas com feromônio que pode ser amplamente distribuído por pulverização para fornecer quase número infinito de fontes pontuais, porém as limitações citadas acima ainda permaneçam (custo, biodegradabilidade, entre outros).

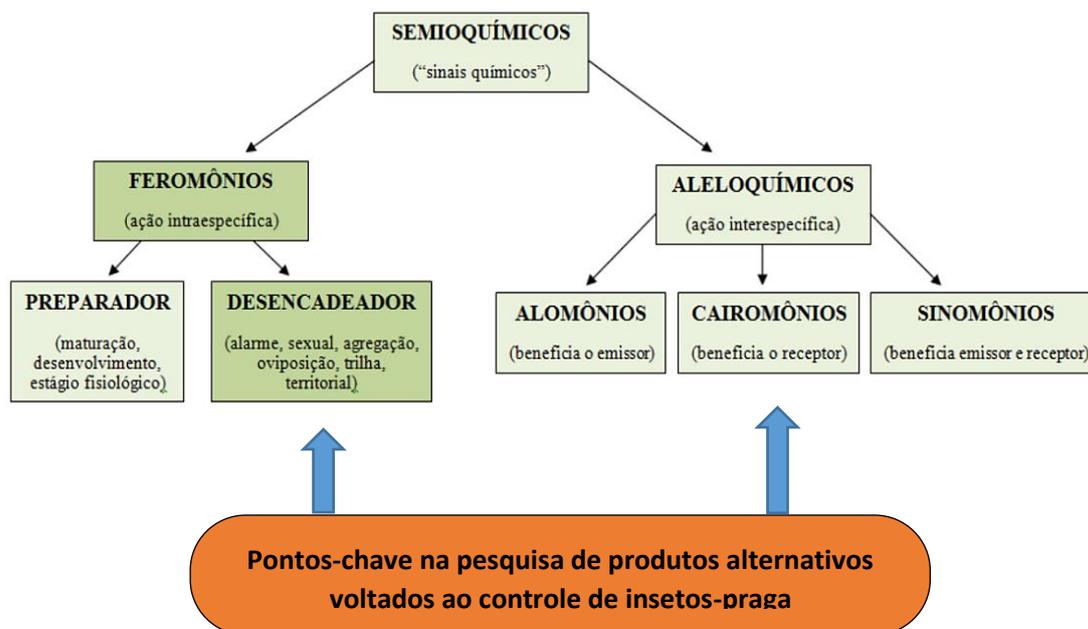
## 2.5 A comunicação química entre os insetos

Em 2009, completou 50 anos da publicação do primeiro artigo de identificação da estrutura química de um feromônio sexual de inseto. Este trabalho pioneiro foi realizado pelo químico alemão Adolf Friedrich Johann Butenandt, premiado com o Nobel de Química de 1939, que encontrou a estrutura química para o feromônio sexual do bicho da seda, a mariposa *Bombyx mori* L. (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE), sendo este trabalho resultado de 20 anos de pesquisa (ZARBIN et al, 2009).

De forma geral, os insetos utilizam sinais visuais, acústicos e químicos para se comunicar. Porém são os sinais químicos, os responsáveis pela comunicação entre o inseto e seu meio ambiente (CORRÊA & SANT'ANA, 2001). Os sinais químicos podem ser identificados a curta ou longa distância e são caracterizados por odores específicos, liberados por diferentes espécies, que permite ao inseto realizar a seleção de plantas, a defesa ou agressão e a escolha do local de oviposição (VILELA, 1987).

Qualquer substância química liberada por um determinado organismo que provoca uma mudança comportamental ou fisiológica em outro organismo é denominada de semioquímico (CORRÊA; SANT'ANA, 2001). Devido à amplitude do termo semioquímico, referente às substâncias químicas e às toxinas, um novo termo foi criado, os infoquímicos, que são substâncias químicas que em seu contexto natural, fornecem informações em uma interação entre dois indivíduos, provocando no receptor uma resposta fisiológica (Figura 18). Os infoquímicos são classificados com base no tipo de interação, se intraespecífica ou interespecífica, e com base no custo-benefício obtido pelos organismos envolvidos na interação (VILELA; DELLA LUCIA, 2001).

Figura 18 - Classificação dos semioquímicos.



Fonte: Adaptado de HOWSE et al., 1998; PEREIRA, 2007

Os aleloquímicos são infoquímicos mediadores de interações entre espécies diferentes que se dividem em cairomônios, com substâncias que beneficiam a espécie receptora do estímulo, alomônios que beneficiam a espécie emissora do estímulo e os sinomônios que beneficiam tanto a espécie emissora quanto a receptora (ZARBIN et al, 1999)

Os feromônios constituem uma mistura de compostos que estão presentes em diferentes proporções, são espécie-específicos (HALDER, 2011; VILELA, 1987) e são utilizados na atração sexual, para agregação, recrutamento, defesa, localização de hospedeiros e para desencadear muitas funções comportamentais PHEROBASE (<http://www.pherobase.com/about/>). Entre as várias vantagens quando comparadas aos pesticidas químicos tem-se:

- a) não afetam populações de pragas secundárias ou inimigos naturais;

**b)** tem baixa toxicidade a mamíferos (SILVERSTEIN, 1981).

Em tefritídeos a exemplo de moscas do gênero *Ragoletis* três grupos principais de semioquímicos foram identificados: (1) aleloquímicos liberados pelo fruto hospedeiro que guia as moscas para o local de oviposição (Cairomônios), (2) feromônio sexual e (3) feromônios marcadores de hospedeiro identificando este como sítio de oviposição (SARLES et al, 2015).

Feromônios, são geralmente obtidos em quantidades diminutas, na ordem de microgramas a miligramas, sendo moléculas orgânicas com centros quirais e/ou insaturações e ramificações, em geral, de baixo peso molecular de 60 a 220 u.m.a., o que garante a volatilidade da molécula (THOMAZINI, 2012). A extração, o isolamento e a identificação de substâncias voláteis de insetos foram relatadas por Zarbin (2001), onde a maior dificuldade refere-se à produção em baixa quantidade e a existência de vários outros compostos inativos, porém quimicamente relacionados aos compostos bioativos.

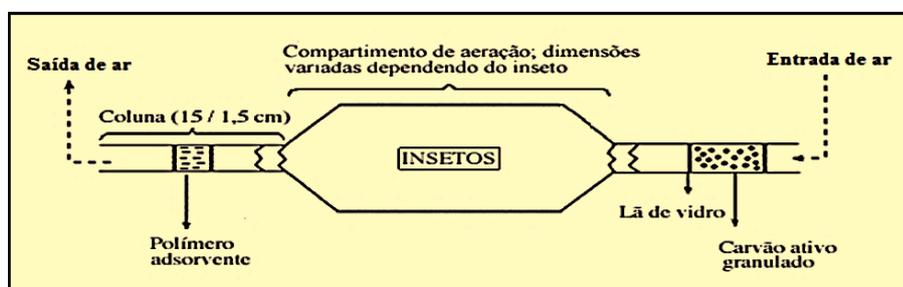
## **2.6 Extração por aeração – Coleta de compostos voláteis.**

A obtenção de extratos a partir de compostos voláteis emanados por insetos ou frutos pode ocorrer pelo emprego de técnicas variadas de coleta desses voláteis. Dentre as técnicas de coleta, a aeração ou *HEADSPACE* DINÂMICO ou *AERAÇÃO*, tem sido uma das metodologias prioritariamente escolhidas em virtude do elevado grau de confiabilidade e reprodutibilidade, bem como também por preservar a integridade da amostra submetida ao processo. Porém, como requisitos para que se tenham asseguradas essas características é necessário entre outros cuidados que todo aparato empregado esteja isento de resíduos, a exemplo de contaminantes externos ou que sejam da composição do material utilizado na fabricação/montagem dos equipamentos, e que possam interferir ou alterar na mistura dos compostos emanados pela amostra em questão (THOLL et al, 2006).

Esta técnica consiste na adsorção dos voláteis liberados pelo organismo ou amostra de interesse em uma matriz capaz de reter os compostos que se busca extrair e tem sido adotada como técnica padrão para a coleta de voláteis em grande parte dos estudos de semioquímicos.

Neste processo, quando se pretende obter os compostos voláteis liberados por insetos, os feromônios, estes coletados empregando-se um sistema de coleta composto por uma câmara de vidro e colunas contendo matriz adsorvente, tal como sílica, carvão ativo e polímeros porosos (Porapak Q<sup>®</sup>, Tenax<sup>®</sup> etc.) (Figura 19) (ZARBIN, 2001). O “aprisionamento” do feromônio ocorre no material adsorvente e sua dessorção é realizada pelo emprego de solvente puro, com baixo ponto de ebulição, normalmente hexano, que possibilita a evaporação sem a necessidade de exposição do material coletado a altas temperaturas.

**Figura 19 - Desenho esquemático de um sistema de coleta de voláteis por aeração.**



Fonte: Adaptado de ZARBIN, 2001.

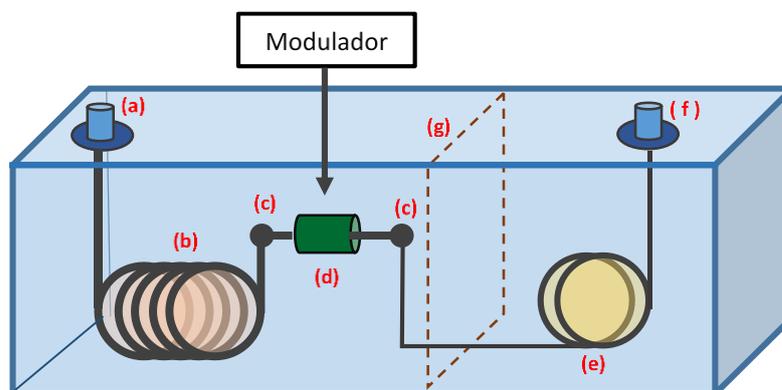
## 2.7 CG X CG/TOF-EM.

A Cromatografia Gasosa Bidimensional acoplada à Espectrometria de Massas com detector *Time-of-Flight* (CG x CG/TOF-EM) é uma técnica analítica conhecida por sua sensibilidade e seletividade que é utilizada para resolver os problemas da co-eluição dos compostos encontrada na Cromatografia Gasosa unidimensional. O CG x CG/TOF-EM possui duas colunas com polaridades diferentes, que são conectadas por um modulador que coleta continuamente pequenas frações da amostra da primeira coluna (1D), reconcentra-as em uma banda estreita e as reinjeta na segunda coluna (2D) (PEDROSO et al., 2009).

O diagrama das etapas de um Cromatógrafo gasoso bidimensional é demonstrado na Figura 20 onde: (a) – representa o local para injeção da amostra, (b) a coluna cromatográfica onde ocorre a separação dos compostos e (d) o modulador criogênico, local do resfriamento através de jatos de CO<sub>2</sub> ou de N<sub>2</sub> líquido, do eluente

da primeira coluna para posterior introdução na segunda coluna. O modulador irá condensar os compostos da coluna (b) e liberar gradativamente todo o eluente na coluna (d). Os fragmentos gerados são capturados por um detector (e), onde os dados obtidos são levados a um banco de dados e, por comparação das massas, é feita a identificação dos compostos (DMANDJA, 2004).

**Figura 20 - Esquema estrutural de cromatógrafo gasoso bidimensional - CG x CG.**



Descrição: Diagrama básico de um sistema CG x CG onde: (a) injetor, (b) coluna primária, (c) conectores de coluna, d) interface CGxCG, (e) coluna secundária, (f) detector e (g) divisão

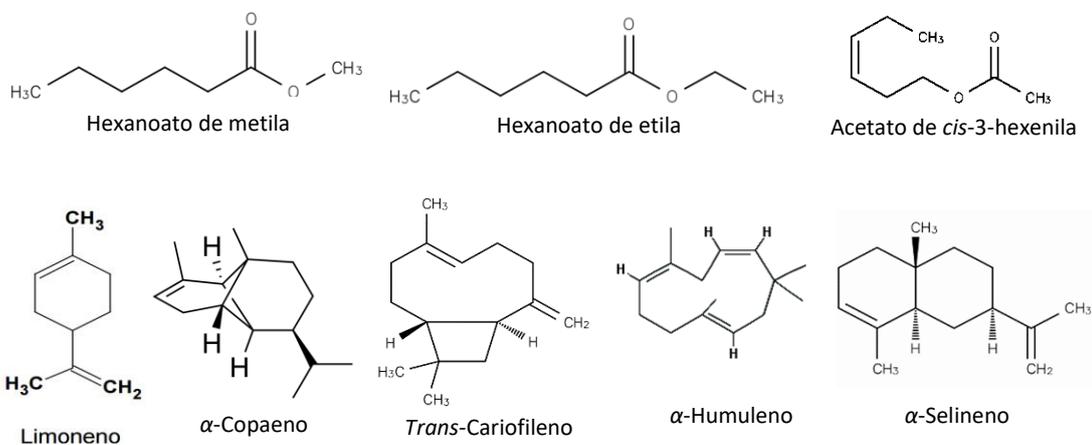
A análise química dos compostos representa uma etapa importante e delicada da pesquisa envolvendo semioquímicos, uma vez que depende diretamente dos equipamentos empregados e da perícia técnica de quem procederá com as análises. Este é um aspecto de grande relevância, em virtude das quantidades diminutas dos compostos presentes nas amostras, havendo portanto, o risco de que alguns dos presentes nas amostras não sejam detectados ou ainda, distinguidos de outros em maior proporção nos extratos, resultando desta forma em resultados imprecisos ou inconclusivos.

## **2.8 Composição química de extratos de frutos de goiaba – *Psidium guajava*.**

A análise química dos extratos hexânicos obtidos a partir da aeração de frutos de goiaba em estágio verde e maduro que foi realizada por Santos (2003), evidenciou em sua constituição a presença de álcoois, cetonas, aldeídos, hidrocarbonetos, compostos sulfurados e principalmente ésteres, com maior presença de terpenos

entre os frutos verdes, e os ésteres alifáticos nos maduros. Destacam-se entre os componentes identificados (Figura 21) nos extratos de frutos verdes e maduros os seguintes compostos: hexanoato de metila, hexanoato de etila, acetato de *cis*-3-hexenila, limoneno,  $\alpha$ -copaeno, *trans*-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e  $\alpha$ -selineno. Na ocasião, a autora demonstrou, mediante a realização de bioensaios, que os insetos apresentaram maior efetividade na percepção de compostos cujas estruturas são menos complexas do ponto de vista de função química ou estrutural, condição que ocorre nos frutos no estágio de maturação menos avançado.

**Figura 21 - Compostos identificados nos extratos de frutos verdes e maduros de goiaba, variedade vermelha.**



Fonte: Obtido e adaptado de PubChem Open Chemistry Database, disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10856363#section=Top>> e ChEBI disponível em <<http://www.ebi.ac.uk/chebi/>>.

## 2.9 Feromônio de espécies do gênero *Anastrepha*.

Normalmente, em grande parte das espécies de insetos, os feromônios sexuais são produzidos por fêmeas para atrair os machos. Porém, para as moscas-das-frutas, os machos são os responsáveis pela produção e a liberação do feromônio sexual. Diversos estudos têm buscado elucidar os mecanismos relacionados à produção, liberação e os efeitos provocados pelos feromônios dos tefritídeos. As glândulas salivares e o papo desses insetos são as estruturas apontadas na literatura como os sítios de síntese e armazenamento de parte dos compostos que integram a mistura feromonal (GONÇALVES, 2013)

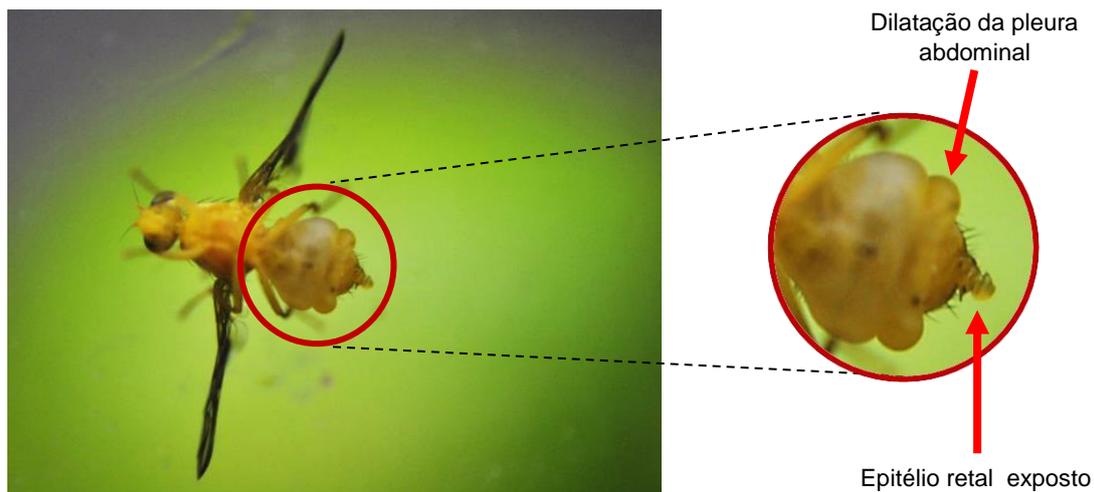
Esses atraentes são, muitas vezes, classificados como feromônio de agregação, pois resultam da atração de ambos os sexos ao sítio de chamamento

(LANDOLT, 1997). As fêmeas também são capazes de produzir feromônio, no entanto sem o propósito de atrair o parceiro. O feromônio produzido por muitas espécies de *Anastrepha* tem por objetivo marcar a superfície do fruto no qual foram depositados os ovos, evitando-se desta forma que outras fêmeas ovipositem na mesma região, o que provocaria superinfestação de larvas e canibalismo entre estas (BIRKE et al, 2013).

Os machos de *A. fraterculus*, quando em chamamento – período ideal para coleta dos compostos voláteis desses insetos, e que se caracteriza, em espécies do gênero *Anastrepha*, já a partir do oitavo dia após a emergência dos insetos adultos (CRUZ-LÓPEZ et al, 2015) – descrevem uma série de comportamentos característicos e que antecedem o ato da cópula. Esses comportamentos são decorrentes de estímulos diversos, de natureza acústica, visual e química, que são recebidos pelos insetos e que os preparam para os eventos posteriores.

Dentre os comportamentos que caracterizam o processo de chamamento e corte por parte dos machos do gênero *Anastrepha*, está a contração do abdome, a agitação das asas e exposição da bolsa anal (Figura 22), que faz com que os constituintes voláteis do feromônio desses insetos sejam liberados (GONÇALVES, 2001; LIMA & HOWSE, 1997). O comportamento de chamamento exibido pelos machos do gênero *Anastrepha* pode ocorrer em períodos variados do dia, a depender da espécie estudada ou também em virtude das condições do ambiente. Em *A. striata*, o início desse comportamento foi mais evidente durante o período da tarde (CRUZ-LÓPEZ et al, 2015). Em *A. obliqua* e em *A. fraterculus* os comportamentos de chamamento e cópula foram descritos ocorrendo durante o período matinal (ALUJA & BIRKE, 1993; GONÇALVES et al, 2013).

**Figura 22 - Macho de *A. fraterculus* em atividade de chamamento expondo o epitélio retal.**



O feromônio liberado pelos machos de *A. fraterculus* atrai as fêmeas para o acasalamento e outros machos para a formação dos leks (agregação de machos), que consiste numa estratégia utilizada pelos machos de tefritídeos com o intuito de potencializar o efeito das substâncias que estão sendo liberadas pelos mesmos, de modo a se garantir sucesso na atividade reprodutiva.

Essas assembleias são formadas por machos que liberam o feromônio atraindo outros machos para o comportamento de corte que envolve a liberação de sinais químicos, visuais e acústicos que atraem fêmeas sexualmente receptivas, as quais, após interagirem com alguns machos do grupo, escolhe um deles para a cópula (Figura 23) (LIMA-MENDONÇA, 2014). Assim para a fêmea atraída pelo feromônio, este sinal pode ser também classificado como feromônio sexual.

**Figura 23 - Casal de *A. fraterculus* em cópula**



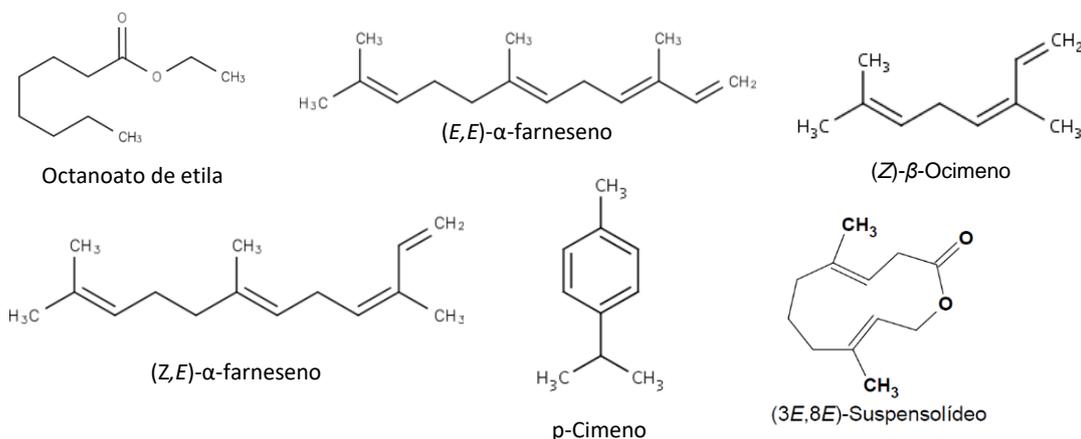
Foto: Autor

Diversos trabalhos sobre semioquímicos de tefritídeos têm sido realizados com o intuito de identificar compostos envolvidos na comunicação desses insetos e nas estratégias utilizadas por esse grupo na busca de frutos hospedeiros e parceiros sexuais. A capacidade de fêmeas de *A. striata* detectar os voláteis emitidos pelos machos dessa espécie, em meio à imensa quantidade de compostos similares emanados dos frutos hospedeiros desta espécie e dispersos no ambiente, também foi discutida (CRUZ-LÓPEZ et al, 2015).

A literatura sobre feromônios com moscas do gênero *Anastrepha*, relata a existência de 86 compostos já descritos constituindo misturas feromonais. (<<http://www.pherobase.com/database/compbygen/genus-comp-anastrepha.php>>

Acesso em 19 de março de 2017). Entre os constituintes voláteis identificados na composição do feromônio sexual de machos de espécies do gênero *Anastrepha* (Figura 24) merecem atenção especial os seguintes compostos: hexanoato de etila, Linalol, octanoato de etila, (*Z*)-3-Nonen-1-ol, (*Z,Z*)-3,6-Nonadien-1-ol, (*E,E*)- $\alpha$ -Farneseno, (*Z,E*)- $\alpha$ -Farneseno,  $\alpha$ -Copaeno *p*-Cimeno, Limoneno, (*Z*)- $\beta$ -Ocimeno, (*E,E*)-Suspensolídeo, Anastrefina, Epianastrefina, em virtude destes compostos serem relatados em diversos estudos, bem como por terem sido identificados em indivíduos de populações de áreas geográficas distintas (BŘÍZOVÁ et al, 2013; LÓPEZ-GUILLÉN et al, 2011; MILET-PINHEIRO, 2015). Durante pesquisas realizadas por LIMA e colaboradores (2001), constatou-se também a presença do (*3E,8E*)-Suspensolídeo entre os compostos liberados por machos de *A. suspensa*.

**Figura 24 - Compostos identificados no feromônio de moscas-das frutas do gênero *Anastrepha*.**



Fonte: Obtido e adaptado de PubChem Open Chemistry Database, disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10856363#section=Top>>

Além da identificação dos compostos que são liberados pelos machos em chamamento, diversos autores também têm se dedicado a esclarecer fatores que possam influenciar no potencial dos compostos em atrair os insetos, na composição da mistura feromonal, e qual ou quais os locais no organismo do inseto que participam dos processos de síntese ou armazenamento desses compostos. A exemplo disto, podem ser citados os resultados obtidos por Gonçalves e colaboradores (2006, 2013), cujas evidências associavam o armazenamento e também possivelmente a síntese do feromônio sexual de *C. capitata* e de *A. obliqua* nas glândulas salivares dos machos destas espécies.

Diversos estudos têm evidenciando a potencial influência dos compostos voláteis presentes nos frutos que servem de alimento e que compõem a mistura liberada pelos insetos. Santos (2003) e Silva (2005), em experimentos conduzidos no Laboratório de Ecologia Química – LEQ/IQB/UFAL, demonstraram que havia similaridades entre os compostos identificados na mistura feromonal de machos de *A. fraterculus* e seu fruto hospedeiro (*P. guajava*) e de machos de *C. capitata* e o hospedeiro *Carica papaya* (mamão), respectivamente. Cruz-López e colaboradores (2016, 2015) argumentam de maneira semelhante, a partir de estudos realizados com *A. striata*, que a mistura feromonal emanada pelos machos em chamamento é impactada pelos compostos voláteis existentes nos frutos de goiaba que serviram como hospedeiro desses insetos durante a fase larval.

Em 2010, estudos realizados por VERA e colaboradores (2013) constataram que machos selvagens de *A. fraterculus*, adultos, que haviam sido expostos a voláteis de frutos de goiaba durante pelo período de 15 dias, apresentaram significativa vantagem durante o processo de cópula, ante aos insetos não submetidos aos voláteis. Além disso, o grupo ainda verificou que os machos de *A. fraterculus* não submetidos a esse tratamento, passaram a apresentar comportamento de cópula mais precocemente em relação ao grupo de insetos testemunha.

## **2.10 Bioensaios.**

Os bioensaios, por meio de seus procedimentos, permitem através de modelos experimentais controlados, eliminar todas as interferências que ocorrem no ambiente. (INDERJIT; DAKSHINI, 1995). Portanto, eles avaliam as respostas biológicas de um organismo frente a uma substância, de modo que sejam minimizados os fatores possam prejudicar as avaliações dos comportamentos e das respostas observadas e analisadas.

Estudos dos mecanismos comportamentais pelos quais os insetos escolhem suas plantas hospedeiras contribuem para formulação de hipóteses sobre os padrões das associações observadas na natureza. Para uma explicação final, no entanto, que define por que estas associações existem, são necessários estudos dinâmicos que

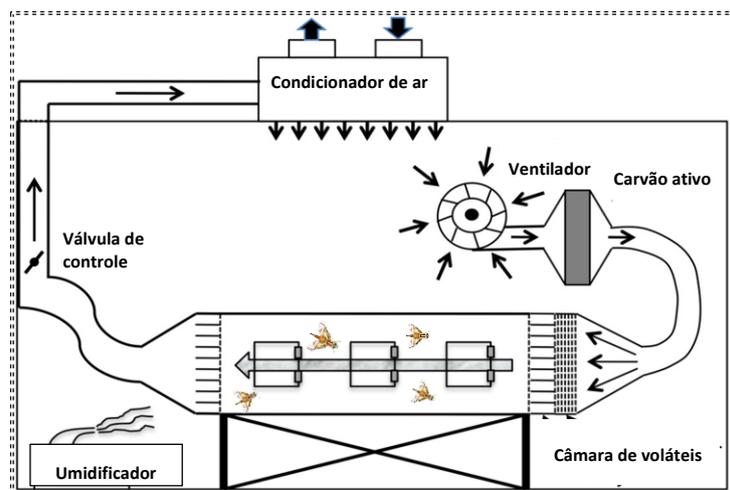
consideram também as consequências de plantas que respondem a estas escolhas (BARRIOS-SAN MARTÍN et al, 2014; KNOLHOFF & HECKEL, 2014).

Como já mencionado anteriormente, os insetos se utilizam de estímulos visuais, acústicos e olfativos para se comunicar ou mediar e promover diversos comportamentos, a exemplo do reprodutivo e de seleção alimentar.

Para tanto, os insetos ficam expostos aos extratos com as substâncias a serem testadas, podendo ser realizado com duas ou mais substâncias simultaneamente ou individualmente. Alguns fatores como a temperatura, umidade e luminosidade devem ser controlados (KAINOH, 2011) do modo a torná-las adequadas ao objetivo da pesquisa levando em consideração primordialmente os hábitos e estilo de vida do inseto.

Os testes comportamentais ou bioensaios são realizados em laboratório, em condições seminaturais<sup>3</sup> ou no campo. Em laboratório, os bioensaios geralmente são conduzidos, em três tipos básicos de equipamentos: os olfatômetros e túneis de vento (Figura 25), nos quais as moléculas do odor testado são transportadas em direção aos insetos por uma corrente de ar provocada; e as arenas, estruturas bem mais simples, nas quais não se utiliza fluxo de ar (FERRARA et al, 2001; HOWSE et al, 1998; MAFRA-NETO & CARDÉ, 1998).

**Figura 25 - Representação esquemática de um túnel de vento empregado na realização de bioensaios comportamentais com insetos.**



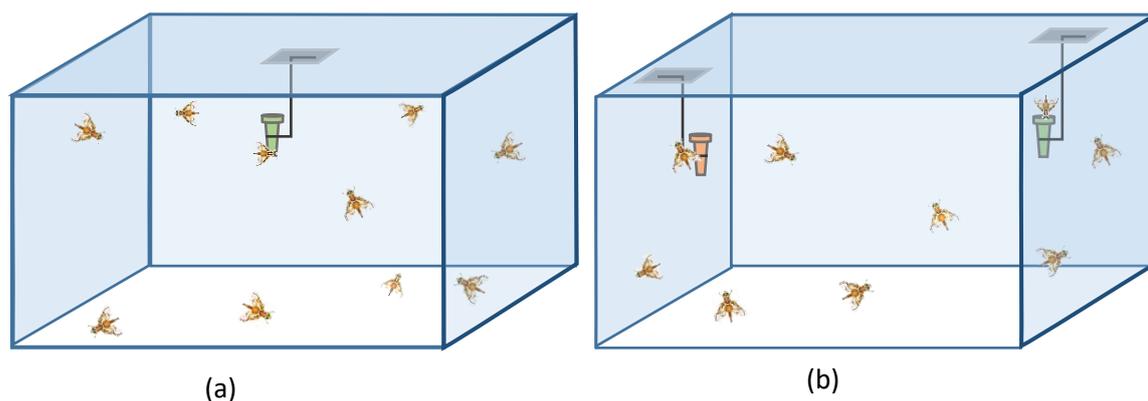
Fonte: Adaptado de Kainoh, 2011

<sup>3</sup> Bioensaios em condições seminaturais correspondem a testes realizados em estrutura que busca assemelhar as condições do teste às condições naturais do ambiente. Normalmente, bioensaios dessa natureza ocorrem em casa de vegetação ou telados instalados ao ar livre.

As arenas por sua vez, são caixas transparentes muito utilizadas para testes com extratos. São normalmente de vidro ou acrílico, e em seu interior, um grupo de insetos é exposto ao estímulo testado (extrato) e ao controle (geralmente o solvente utilizado no extrato). Os testes podem ocorrer avaliando-se os tratamentos (extrato e controle) isoladamente ou ambos simultaneamente (Figura 26). As amostras a serem testadas são introduzidas no ambiente em substratos, os quais podem ser discos de papel de filtro ou septos de borracha impregnados com um destes dois materiais e posicionados em extremidades opostas do espaço interno.

A atratividade do material de teste é avaliada comparando a quantidade de aproximações dos insetos ao substrato impregnado com este material com aquelas ao controle. Pode ser observada também a sequência de movimentos descrita pelo inseto quando próximo à substância testada, para avaliar em que extensão esta substância influencia um determinado comportamento. Como não há passagem de fluxo de ar no interior das arenas, os insetos só podem manifestar respostas comportamentais a curta distância.

**Figura 26 - Representação esquemática de arenas empregadas em bioensaios com insetos voadores: (a) arena com apenas um único tratamento; (b) arena com dois tratamentos.**



Diagramação: Autor

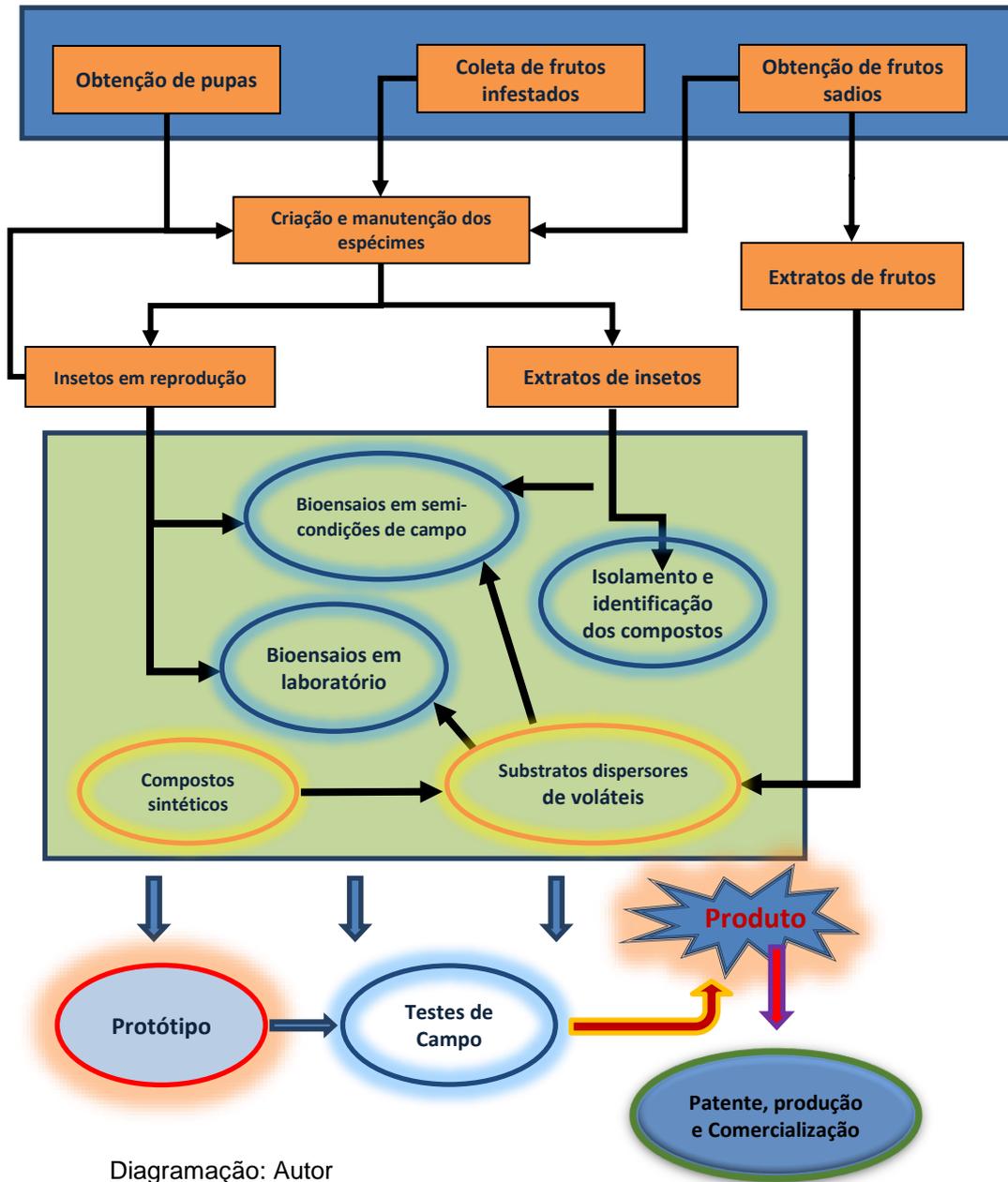
Pelo mesmo motivo, o tamanho da arena e o tempo de exposição dos insetos ao estímulo devem ser adequados a cada espécie estudada, visto que em um ambiente fechado, após certo tempo, todas as moléculas de odor se encontram

igualmente distribuídas. Apesar destas desvantagens, as arenas são utilizadas pela sua facilidade de construção e utilização (FERRARA et al, 2001; HOWSE et al, 1998; MAFRA-NETO & CARDÉ, 1998). Arenas de maiores dimensões podem ser utilizadas para testar a atratividade de insetos para material proveniente de vegetais, como folhas, flores e frutos.

Todo o trabalho relacionado com a pesquisa de semioquímicos, principalmente dos organismos que são considerados pragas da agricultura, têm como um dos propósitos a obtenção de produtos que possam ser formulados e disponibilizados no mercado como uma alternativa segura e eficaz para o monitoramento e controle das pragas nas culturas. Ademais, observa-se ainda que substratos usados como dispersores de feromônios empregados em armadilhas de monitorização e dispositivos de eliminação não são normalmente bem estudados e os atrativos são liberados a velocidades descontroladas, levando à baixa eficiência e eficácia da estratégia empregada o que resulta em estimativas de monitorização enganosas (NAVARRO-LLOPIS et al, 2011).

O esquema a seguir (Figura 27) descreve as etapas básicas que abrangem uma pesquisa com semioquímicos de moscas das frutas, desde a identificação até a possível disponibilização de iscas para o mercado.

Figura 27 - Etapas de pesquisa, elaboração e disposição de iscas para uso no controle de moscas-das-frutas.



Diagramação: Autor

Em relação a tefritídeos, bioensaios de comportamento haviam sido descritos anteriormente por Robacker (1988) para *Anastrepha ludens*, por Canale et al (2013) com *Bactrocera oleae*, Navarro-Llopis et al (2011) para *C. capitata* e para *A. fraterculus*, Vera et al (2013) e Bachmann (2015), e consistiram principalmente em observações sobre o comportamento reprodutivo e alimentar.

### 3 REVISÃO PATENTÁRIA

A prospecção de insumos, produtos e técnicas aplicáveis ao monitoramento e controle de pragas agrícolas, tal como as moscas-das-frutas, tem fomentado o surgimento de verdadeiros celeiros e empresas de tecnologia voltadas às mais distintas áreas do agronegócio, seja no aspecto da estruturação, mecanização e automação dos processos produtivos, seja no tocante ao desenvolvimento de cultivares resistentes a pragas e doenças, ou de produtos voltados à proteção das culturas e ao aumento da produtividade, mas que também sejam menos agressivos ao meio ambiente e à saúde dos consumidores.

Nessa seara, há que se destacar os avanços conseguidos a partir de processos e técnicas de biotecnologia que permitiram, por exemplo, o desenvolvimento de organismos, principalmente cultivares, transgênicos. Em outro segmento, a identificação e produção de compostos e soluções que possam desempenhar atividade de controle de insetos praga.

A despeito da ampla gama de inseticidas utilizados, a perspectiva quanto ao emprego de semioquímicos que sejam seletivos e que funcionem como atraentes de moscas-das-frutas em pomares comerciais, tem sido fortalecida e gradativamente e tem apresentado resultados animadores do ponto de vista da segurança e eficácia.

No universo de registro industrial/comercial dos semioquímicos identificados para uso na fruticultura, em especial, para o controle de moscas-das-frutas, a holding suíça Syngenta é detentora de mais de 15% de todas as patentes relacionadas ao assunto no mundo (GOOGLE PATENTS, 2017).

Entre as formulações precursoras que foram desenvolvidas para controle de espécies de tefritídeos Howse, em 1989, obteve registro (Patente nº 4,820,513) de formulações atrativas para várias espécies de tefritídeos – *Dacus*, *C. capitata* e *A. ludens*), cujas formulações com maior eficácia para machos das espécies avaliadas foram as que tinham o linalol em sua. Lance & Gates propuseram em 1994 misturas à base de metil eugenol, cuelure, sais de amônia e uma mistura contendo 1,7-dioxaspro-[5,5]-undecano com  $\alpha$ -pineno ou *n*-nonanal específicas para mosca do gênero *Dacus*; e para as moscas do gênero *Rhagoletis* propuseram uma composição com acetato de hexila, acetato de (*E*)-2-hexenila, 2-metilbutanoato de butila,

hexanoato de propila, hexanoato de hexila, hexanoato de butila e butanoato de hexila. Em 2000, Heath & Epsky obtiveram registro de patente de uma mistura atrativa para *A. ludens* e *A. suspensa* composta por 3-metil-1-butanol, ácido acético e amônia ou putrescina (Patente WO 00/16617).

Rivera e colaboradores (2010) propuseram a formulação de soluções à base de ésteres (butirato de etila, butirato de isopropila, butirato de propila, butirato de isobutila, hexanoato de etila, butirato de isopentila, benzoato de etila, octanoato de etila) compondo isoladamente ou na forma de mistura de ésteres e ésteres mais álcool (hexanol) a fórmula geral em concentrações que variam entre 0,5% e 40% de cada éster, atrativas para *A. obliqua* (Patente PI 0610227-1 A2)

Entre produtos com registro de patente vigentes, os de solicitação mais recente destacam-se por possuírem em suas misturas compostos presentes e identificados nos feromônios sexuais da espécie em questão ou nos voláteis liberados pelos frutos hospedeiros, a exemplo da formulação proposta por Teal & Walse (2012) (Patente nº US 8,128,948 B1) voltada ao controle de *A. suspensa* que tem em sua formulação Suspensolídeo e opcionalmente uma fração de  $\gamma$ -hidroxiácido de Epianastrefina,  $\gamma$ -hidroxiácido de Anastrefina, ácido 2,6-dimetil-6-vinil-cicloexenoacético,  $\beta$ -D-glicopiranosil, 2,6-dimetil-6-vinil-ciclo-1-hexeno-1-acetato, ou uma mistura desses, porém não contendo compostos como o  $\beta$ -bisaboleno e o  $\alpha$ -Farneseno.

Avaliando-se além da capacidade de atração de iscas comerciais (Proter<sup>®</sup> (Química Bravo), Captor 300<sup>®</sup> (Química Lucava), Winner<sup>®</sup> (IQC), Proteínas hidrolisadas 30sl<sup>®</sup> (Syngenta), CeraTrap<sup>®</sup> (Biolberica) mas também o substrato de dispersão dos semioquímicos destas iscas, foram propostos duas matrizes: uma de materiais compostos de polímero reticulado e outra de material misto de polímero reticulado e material adsorvente inorgânico, cujos resultados apresentaram persistência de liberação dos voláteis por até 65 dias durante os ensaios realizados (Patente MX2015010739) (MIRELES et al, 2016).

## 4 OBJETIVO GERAL.

**Parte 1-** Identificar a composição química do feromônio sexual liberado por machos de populações de *A. fraterculus* de diferentes localidades brasileiras, com a posterior caracterização química destas populações;

**Parte 2-** Desenvolver formulações com os compostos identificados e reportados na literatura para o fruto hospedeiro preferencial desta espécie e avaliar sua eficácia quando microencapsuladas em substrato biopolímero, através da realização testes em laboratório, com vistas a subsidiar sua viabilidade futura para o manejo integrado desta praga.

## 5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- I. Extrair os constituintes voláteis liberados por machos de *A. fraterculus*, em chamamento, provenientes das populações selecionadas para este estudo, pelo emprego da técnica de aeração;
- II. Identificar os compostos presentes nos extratos de machos de populações domesticadas que ocorrem nas populações acima pelo emprego de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas Bidimensional (CG x CG-TOF-EM);
- III. Verificar a existência de similaridades e diferenças, entre a composição química da mistura de constituintes liberados por machos das populações-alvo deste estudo e a das populações já estudadas em estudos anteriores (Insetos de Maceió-AL e Bento Gonçalves – RS), mensurando-se estas através de análises multivariadas com vistas a identificar o grau de compatibilidade e reconhecimento existente entre as populações estudadas;
- IV. Extrair os constituintes voláteis do fruto hospedeiro preferencial de *A. fraterculus* (goiaba), nos estágios verde e maduro, para servirem de tratamento-testemunha na condução posterior de bioensaios com formulações dos compostos sintéticos;

- V. Desenvolver formulações contendo diferentes combinações das compostos sintéticos identificados neste estudo e/ou os reportados na literatura, em frutos de goiaba, como atraentes para fêmeas de *A. fraterculus*;
- VI. Verificar a eficácia do emprego de substrato de dispersão (isca) à base de biopolímero;
- VII. Conduzir ensaios de laboratório para determinar dentre as formulações obtidas, quais as mais eficazes na atratividade de fêmeas virgens e acasaladas de *A. fraterculus*, com 9, 12 e 15 dias de idade, comparando-as com a atratividade destas fêmeas frente aos extratos do fruto hospedeiro;
- VIII. Padronizar as formulações desenvolvidas e identificadas entre as mais eficazes na atratividade de *A. fraterculus* a fim de possibilitar a produção em escala comercial para disponibilizar ao segmento fruticultor uma alternativa segura e eficaz de controle desta praga.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Obtenção de frutos e coleta de larvas de *A. fraterculus*

Os frutos de goiaba – variedade Paluma (de polpa vermelha) - destinados à aeração para coleta de voláteis e para servirem como substrato de oviposição foram adquiridos semanalmente em supermercados locais e levados ao laboratório onde passaram por uma limpeza com água corrente e detergente, seguida de transferência para um balde e imersão em água à temperatura de 60 °C por 1 minuto. A lavagem tem por finalidade retirar impurezas e possíveis contaminantes que possam estar aderidos ao fruto, enquanto a imersão em água quente serve como tratamento para eliminação de possíveis larvas existentes no interior do fruto, de modo a se evitar a introdução de insetos selvagens e de outra espécie ao plantel. Os frutos infestados com larvas de *A. fraterculus* foram obtidos através de coletas realizadas no município de Coruripe (AL) em pomares de goiaba da região sob a gestão de agricultores cooperados da Cooperativa Pindorama (10°8'1"S, 36°10'34"W). Em cada coleta realizada, os frutos obtidos foram distribuídos em cestos plásticos perfurados e acondicionados em gaiolas de isopor (Figura 28) com abertura na tampa e nas laterais que foram preenchidas com tecido tipo *voil*, para facilitar a aeração em seu interior.

**Figura 28 – Caixas com frutos infestados por larvas de *A. fraterculus*.**



(a)



(b)

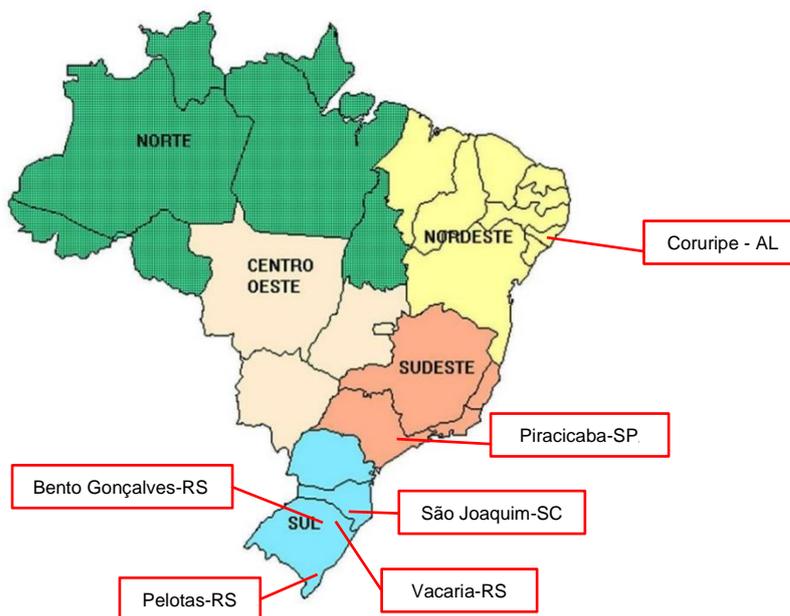
Foto: Autor.

## 6.2 Obtenção das populações de *Anastrepha fraterculus* adultas

As populações de *A. fraterculus* que foram criadas e estabelecidas no Laboratório de Ecologia Química, do Instituto de Química e Biotecnologia – UFAL, em Maceió, Alagoas tinham as seguintes procedências (Figura 29):

- População de **Bento Gonçalves-RS**: Pupas enviadas pela Embrapa Uva e Vinho - RS;
- Populações oriundas de **Vacaria-RS**, **Pelotas-RS**, **São Joaquim-RS** e **Piracicaba-SP**: Pupas enviadas pelo Departamento de Biologia Animal, da Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA;
- População de Alagoas: obtida a partir de larvas presentes em goiabas infestadas, coletadas em pomares pertencentes a agricultores cooperados da Cooperativa Pindorama, **Coruripe - AL** (10° 04'53" S e 36°03'91" W).

**Figura 29 - Localidades das quais foram provenientes os insetos utilizados para obtenção dos extratos e realização dos bioensaios.**



Adaptado pelo autor.

Entre 12 e 15 dias após a coleta dos frutos infestados por larvas e a transferência destes para as caixas de isopor, conforme descrito acima, os insetos começavam a emergir. Estes eram coletados, identificados quanto ao sexo, sendo que uma parte dos insetos era transferida para gaiolas de reprodução, enquanto os

demais eram separados por sexo e transferidos para gaiolas de vidro (Figura 30) (20cm x 30cm x 15cm), para a obtenção de extratos de machos, e as fêmeas para a realização de bioensaios e para identificação da espécie.

**Figura 30 – Gaiolas de criação contendo populações de *A. fraterculus*.**



Foto: Autor.

Nas gaiolas de reprodução foram disponibilizados aos insetos frutos de goiaba em estágio intermediário de maturação, adquiridos em supermercados, para servirem como sítio de oviposição das fêmeas (Figura 31 a - b). Para estes frutos teve-se o cuidado de submetê-los a um tratamento térmico através da imersão durante 10 (dez) minutos em água a uma temperatura aproximada de 60 °C, cujo objetivo consistia na eliminação de larvas que possivelmente pudessem existir nesses frutos, buscando-se assim garantir que os insetos obtidos correspondiam de fato à linhagem do laboratório, e não de insetos selvagens introduzidos acidentalmente.

**Figura 31 - Casais de *A. fraterculus* em frutos para reprodução (a) e fêmea ovipositando em fruto (b).**



(a)



(b)

Fotos: Autor

### **6.3 Manutenção das populações de adultos de *A. fraterculus* em laboratório.**

Após serem transferidos para gaiolas, os insetos eram mantidos em gaiolas de vidro (20 cm x 30 cm x 15 cm) em sala com fotoperíodo controlado (14L:10D)<sup>4</sup>, temperatura média 24 °C ± 2 °C, e umidade relativa do ar média de 70%, alimentados a partir de uma dieta disposta em placa de *Petri*, composta com açúcar mascavo, extrato de soja, levedura de cerveja desidratada e gérmen de trigo na proporção (3:3:1:1), além de água, em separado, disponível em copo descartável devidamente tampado, com uma pequena abertura na tampa e uma fita de esponja vegetal umedecida. A troca da alimentação foi realizada duas vezes por semana. Cada gaiola de criação foi mantida suspensa por um tubo plástico dentro de uma bacia com água e detergente, para se evitar ataques de predadores. A limpeza das gaiolas foi realizada a cada 15 dias.

### **6.4 Obtenção de extratos de frutos de Goiaba – *Psidium guajava*.**

Com vistas à realização das análises químicas e realização dos bioensaios comportamentais, frutos e insetos foram submetidos a técnicas de extração de compostos voláteis conforme protocolos previstos na literatura (NATION, 1990; ZARBIN et al, 1999), bem como através de esquemas nos quais essas técnicas sofreram adaptações.

Para a coleta dos compostos voláteis liberados por frutos de goiaba, foram utilizados aproximadamente 250 gramas de frutos intactos de goiaba, nos estágios verde e maduro de maturação, os quais foram colocados em um dessecador de vidro adaptado (Figura 32), conforme o esquema a seguir.

---

<sup>4</sup> As siglas L e D referem-se aos termos *Light and Dark*, os quais correspondem aos períodos de “claro” e “escuro” durante o transcorrer do experimento.

**Figura 32 - Aparato para coleta de voláteis de frutos de goiaba. (a) bomba de ar; (b) fluxômetro; (c) câmara de aerção; (d) trap contendo carvão ativo; (e) trap contendo material adsorvente; (f) temporizador.**

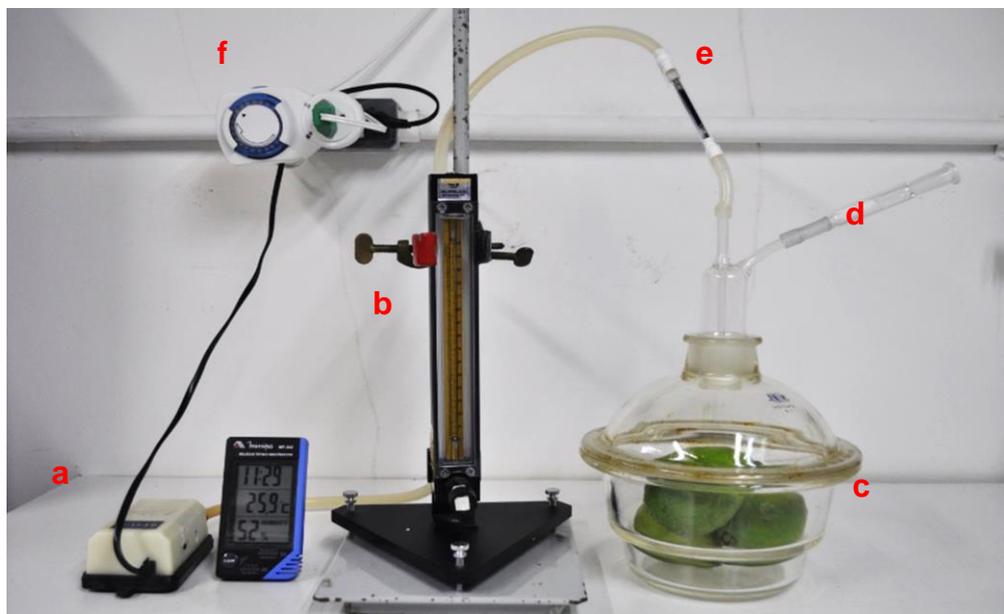


Foto: Raphael Tavares

Nesse sistema, o ar que sai através da saída (e) gera um vácuo no interior da câmara de coleta (c), fazendo com que entre ar através da entrada (d), na qual está acoplado um filtro de carvão ativo cujo objetivo é reter quaisquer impurezas presentes no ar, e que poderiam influenciar no resultado das análises. Assim, o processo consiste no arraste dos voláteis liberados pelos frutos pela corrente de ar gerada no interior da câmara, com fluxo constante de 1 L/min. de modo que ficassem retidos ao passarem por um tubo contendo 100 mg de polímero adsorvente (Tenax®). Cada repetição deste procedimento durou 24 horas, iniciando as 9 horas da manhã e terminando no mesmo horário no dia seguinte e repetido 10 vezes, sob temperatura média de  $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e umidade relativa do ar média de 75%. O filtro adsorvente contendo os compostos voláteis foi lavado com 3 mL de hexano grau HPLC  $\geq 97\%$  (Sigma-Aldrich) redestilado. Os extratos obtidos foram transferidos para ampolas de vidro de 2 mL, em seguida seladas e mantidas em freezer à temperatura de  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até sua utilização em experimentos subsequentes (GONÇALVES, 2005; SANTOS, 2003).

Os extratos obtidos nesta etapa serviram exclusivamente para utilização nos ensaios de laboratório, como tratamento-testemunha, visto que os compostos presentes nos mesmos já haviam sido identificados por Santos (2003).

### 6.5 Coleta dos constituintes voláteis liberados por machos de *A. fraterculus* em chamamento.

Grupos de 20 machos virgens, com idades entre 15 e 20 dias, em chamamento, de cada população de *A. fraterculus* foram colocados, separadamente, em câmaras de vidro (500 mL) (Figura 33) as quais foram submetidos à mesma metodologia descrita acima (item 6.4).

Deve ser levado em conta que para este procedimento, o sistema de coleta foi mantido em ambiente nas mesmas condições nas quais estavam sendo mantidas as gaiolas de criação, a fim de que não houvesse mudança nos padrões de temperatura, umidade e luminosidade – temperatura ambiente média de  $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa do ar média de 75%, e fotoperíodo de 14L:10D – de modo a se evitar interferências no comportamento dos insetos.

**Figura 33 - Aparato para coleta de voláteis emitidos por machos de *A. fraterculus*. (a) bomba de ar; (b) fluxômetro; (c) câmara de aeração; (d) trap contendo carvão ativo; (e) trap contendo material adsorvente.**

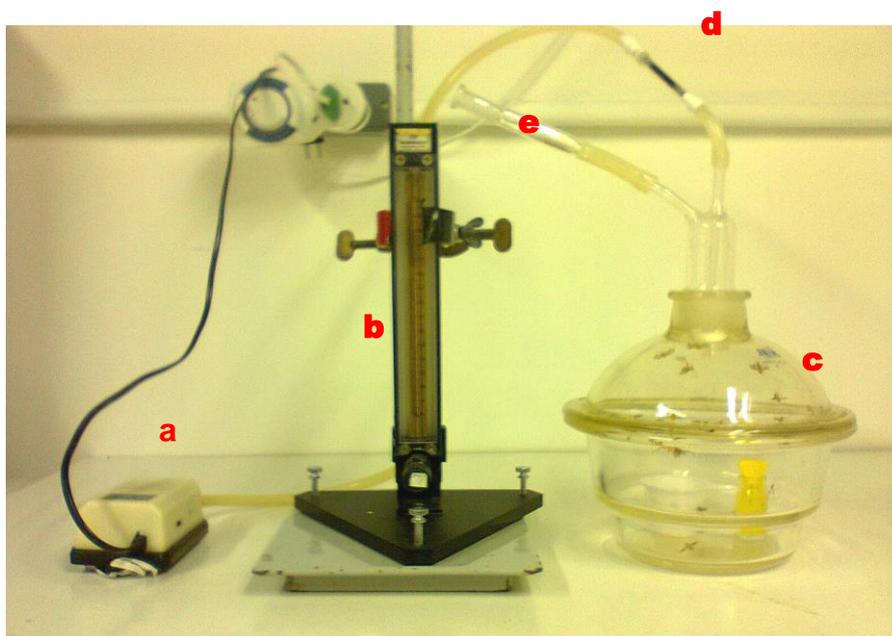


Foto: Raphael Tavares

Os extratos obtidos, também a partir da dessorção com hexano grau HPLC  $\geq$  97% (Sigma-Aldrich), foram transferidos para ampolas de vidro de 2 mL, as quais foram seladas e posteriormente mantidas em freezer à temperatura de  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  até que fossem realizadas as análises.

## 6.6 Análise dos extratos de machos de *A. fraterculus* em chamamento por GC x GC/TOF-MS.

Os extratos hexânicos obtidos a partir das aerações de machos das populações de *A. fraterculus*, foram analisados por Cromatografia Gasosa bidimensional acoplada à Espectrometria de Massas com detector *time-of-flight* (GC x GC/TOF-MS) a fim de se identificar os compostos voláteis presentes nas misturas liberadas por estes insetos. As análises foram conduzidas, pela Dra. Lucie Vaničková no laboratório de Infoquímicos, do *Institute of Organic Chemistry of the Academy of Sciences of the Czech Republic*, em Praga, República Tcheca, empregando-se o instrumento LECO Pegasus 4D (Figura 34) equipado com um criomodulador quad-jet estático (LECO Corp., St. Joseph, Missouri).

**Figura 34 - Cromatógrafo GC x GC/TOF-MS LECO Pegasus 4D do Institute of Organic Chemistry of the Academy of Sciences of the Czech Republic.**



Extraído de: <http://www.uochb.cz/web/structure/1068.html>

Amostras contendo  $1\text{ }\mu\text{L}$  do extrato de machos foram introduzidas no injetor do cromatógrafo e os compostos foram separados nas colunas capilares (características:

primeira coluna – 30 m × 250 µm ID × 0,25 µm - ZB-5MS (Phenomenex, CA, EUA). Segunda coluna: 2 m × 100 µm ID × 0,20 µm RTX-50 (RESTEK, Bellefonte, PA, EUA) contidas no primeiro e segundo fornos do instrumento. As zonas de aquecimento do cromatógrafo foram programadas para operar nas seguintes condições: temperatura do 1º forno: temperatura inicial de 40 °C, com velocidade de aquecimento de 5 °C/min até atingir a temperatura de 190 °C; seguida de um aquecimento de 20 °C/min até atingir a temperatura final de 320 °C; temperatura do 2º forno: temperatura inicial de 50 °C aumentando para 200 °C a uma velocidade de aquecimento de 5 °C/min, seguido de um aquecimento 20 °C/min até a temperatura final de 330 °C; temperatura do injetor (*splitless*) 220 °C; temperatura do detector (TOF): 220 °C. O gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 1 mL/min e a energia de ionização de 70 eV.

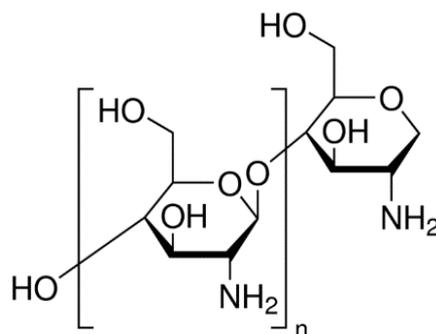
Os dados obtidos foram registrados e armazenados em computador para análises subsequentes. Os compostos presentes nos extratos foram identificados por comparação do padrão de fragmentação de seus espectros de massas, tempo de retenção e índice de retenção com dados publicados previamente e soluções de padrões sintéticos, obtidos comercialmente (Sigma-Aldrich, Brasil). Na ausência de padrões sintéticos, as identificações foram realizadas por comparação dos espectros de massas dos compostos presentes nos extratos com os espectros disponíveis nas bibliotecas do instrumento (NIST, Wiley/NBS) e em compilações disponíveis de índices de retenção. Os índices de retenção (IR, índice de Kovats) dos compostos identificados foram calculados através de co-injeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C8-C22, Sigma-Aldrich, Brasil).

## **6.7 Uso de biopolímero para microencapsulamento.**

Visando a realização de testes de atração dos insetos pelos compostos, avaliando de maneira concomitante a durabilidade no tempo de dispersão da amostra-teste, foi utilizado em substituição ao disco de papel de filtro, um biopolímero produzido pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu (IQB-UFAL) e cedido em colaboração, cuja finalidade era de funcionar como agente microencapsulador dos compostos em teste, no intuito de conferir a capacidade de retardar o tempo de dispersão da mistura utilizada como atraente. Este biopolímero à

base de quitosana (Figura 35), apresenta-se em microesferas, sob a forma de um pó fino, nas quais ficam adsorvidos os extratos/compostos a serem testados.

**Figura 35 - Unidade monomérica de quitosana.**



O objetivo destes bioensaios foi testar o uso da quitosana em partículas de tamanho reduzido, como matriz biodegradável ou ambientalmente inócua, para dispersão de voláteis, capazes de atuar de maneira adequada e eficaz como veículos para a aplicação generalizada de feromônios de insetos que podem ser imobilizados sobre um substrato poroso revestido com uma membrana de película de polímero.

Ressalta-se o fato de que a aplicação de compostos atraentes neste substrato caracteriza uma inovação tecnológica proposta pelo Laboratório de Ecologia Química – IQB/UFAL, sob a coordenação da Profa. Dra. Ruth Rufino, e encontra-se em registro de patente no INPI (**Registro: BR1020160038219**).

## **6.8 Bioensaios comportamentais em condições de laboratório**

Os bioensaios comportamento de fêmeas de *A. fraterculus* levaram em conta as seguintes situações:

- a) Avaliação da preferência de fêmeas *A. fraterculus* aos extratos de frutos de goiaba em diferentes estágios de maturação;
- b) Avaliação da influência da idade das fêmeas na resposta para soluções dos compostos sintéticos;

- c) Avaliação da atratividade das soluções dos compostos sintéticos para fêmeas de *A. fraterculus*;
- d) Avaliação da influência da concentração dos compostos na atração de fêmeas de *A. fraterculus*;
- e) Avaliação das respostas de fêmeas às misturas das soluções dos compostos;
- f) Avaliação da eficácia do substrato de biopolímero utilizado frente às respostas de fêmeas virgens e acasaladas de *A. fraterculus* em bioensaios;

Afim de se avaliar a resposta comportamental e o tempo-resposta de fêmeas de *A. fraterculus* quando expostas às amostras-teste, foram realizados bioensaios utilizando-se fêmeas virgens e fêmeas acasaladas de mesma população e idade, previamente identificadas no dorso com tinta atóxica inodora.

Os testes foram conduzidos em gaiolas de vidro (20 cm x 30 cm x 15 cm) teladas, durante a fotofase, em sala com fotoperíodo controlado (14L:10D), temperatura ambiente média de 25 °C ± 2 °C e umidade relativa do ar média de 75%, no horário compreendido entre 8:00h e 12:00h. Para cada repetição foi utilizada uma nova arena e os ensaios consistiram na deposição de 100 µL da formulação-teste em um disco de papel de filtro com 2 cm de diâmetro, sendo este mantido preso na parte central superior da gaiola com o uso de arame e fita adesiva. Duas fêmeas de mesma população foram introduzidas na gaiola, seguindo-se com a observação, por 20 minutos, dos comportamentos exibidos.

Para fins de comparação, outros ensaios foram também efetuados utilizando-se um tratamento testemunha impregnado com 100 µL do extrato de goiaba obtido previamente, e um tratamento controle, com a mesma quantidade de solvente hexano (grau HPLC).

A resposta comportamental das fêmeas constitui as duas variáveis observadas: (1) Comportamento de busca: antenação, voos curtos e disputa entre fêmeas a aproximadamente ≤ 1 cm da fonte de odor e, (2) toque na fonte de odor e permanência por mais de 2 minutos. Na ocorrência ou execução pelo inseto, de cada um dos comportamentos relativos às duas variáveis descritas foram atribuídos os seguintes pesos de relevância:

- ✓ Aproximação do inseto à fonte de odor – Peso 1
- ✓ Pouso sobre a fonte de odor/substrato – Peso 2
- ✓ Permanência sobre o substrato por tempo maior ou igual a 5 segundos – Peso 3

Os bioensaios executados foram delineados de forma inteiramente casualizada, com três repetições por tratamento, levando-se em conta ainda, que nenhum inseto ou grupo houvesse sido submetido ao teste mais de uma vez, sendo avaliados os seguintes parâmetros:

a) Comparação entre a resposta de fêmeas virgens e acasaladas para extratos obtidos de frutos verdes e maduros. Neste experimento foram utilizados dois tratamentos: 1: EFV (extrato de fruto de goiaba verde) e 2: EFM (extrato de fruto de goiaba maduro).

b) Comparação entre a resposta de fêmeas virgens e acasaladas para soluções de diferentes concentrações dos compostos ( $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -*trans*-cariofileno, octanoato de etila, (*R*)-(+)-limoneno e (*S*)-(–)-limoneno), no qual foram utilizados três tratamentos (concentrações): 1: Concentração de 0,1  $\mu$ L/mL; 2: Concentração de 1,0  $\mu$ L/mL e 3: Concentração de 10,0  $\mu$ L/mL.

c) Teste com as misturas dos compostos: neste experimento, seis soluções representando misturas dos compostos testados individualmente foram testadas, perfazendo um total de seis tratamentos:

- ✓ **Mistura 1:** 100  $\mu$ L de cada solução hexânica dos compostos (*R*)-(+)-limoneno,  $\alpha$ -*trans*-cariofileno,  $\alpha$ -copaeno, octanoato de etila) na concentração 10  $\mu$ L/mL);
- ✓ **Mistura 2:** 100  $\mu$ L de cada solução hexânica dos compostos (*R*)-(+)-limoneno,  $\alpha$ -*trans*-cariofileno,  $\alpha$ -copaeno, octanoato de etila) na concentração 1  $\mu$ L/mL);
- ✓ **Mistura 3:** 100  $\mu$ L de cada solução hexânica dos compostos (*R*)-(+)-limoneno,  $\alpha$ -*trans*-cariofileno,  $\alpha$ -copaeno, octanoato de etila) na concentração 0,1  $\mu$ L/mL);

- ✓ **Mistura 4:** 100  $\mu$ L de cada solução hexânica dos compostos (S)-(-)-limoneno,  $\alpha$ -*trans*-cariofileno,  $\alpha$ -copaeno, octanoato de etila) na concentração 10  $\mu$ L/mL);
- ✓ **Mistura 5:** 100  $\mu$ L de cada solução hexânica dos compostos (S)-(-)-limoneno,  $\alpha$ -*trans*-cariofileno,  $\alpha$ -copaeno, octanoato de etila) na concentração 1  $\mu$ L/mL), e;
- ✓ **Mistura 6:** 100  $\mu$ L de cada solução hexânica dos compostos (S)-(-)-limoneno,  $\alpha$ -*trans*-cariofileno,  $\alpha$ -copaeno, octanoato de etila) na concentração 0,1  $\mu$ L/mL).

Para a avaliação dos comportamentos dos insetos, utilizando-se o biopolímero como substrato, as amostras a serem testadas foram preparadas no Laboratório de Eletroquímica – IQB/UFAL, através de adsorção por contato durante 24 horas, a uma temperatura de 25 °C, em diferentes concentrações com 0,1 mg de microesferas impregnadas com os seguintes compostos da mistura feromonal de *A. fraterculus*: [(S)-limoneno (*R*)-limoneno]; octanoato de etila;  $\alpha$ -copaeno e  $\alpha$ -*trans*-cariofileno na proporção de 1:1:1:1), em hexano e com a concentração de 1  $\mu$ g/mL, 0.1  $\mu$ g/mL, 0.01 $\mu$ g/mL.

Dos cinco compostos selecionados, quatro foram utilizados para compor cada amostra-teste, a fim de se obter duas formulações contendo 4 compostos: a primeira contendo **(S)-limoneno**; octanoato de etila;  $\alpha$ -copaeno e  $\alpha$ -*trans*-cariofileno e a segunda contendo **(R)-limoneno**; octanoato de etila;  $\alpha$ -copaeno e  $\alpha$ -*trans*-cariofileno.

Baseando-se no volume da solução foram então geradas duas misturas encapsuladas:

- 1) Com 10  $\mu$ L de solução + 0.1 mg de biopolímero e
- 2) Com 100  $\mu$ L de solução + 0.1 mg de biopolímero

Tanto as soluções dos compostos individuais como as das misturas dos compostos foram preparadas e posteriormente colocadas em um tubo *ependorf* fixado à parte superior da gaiola (Figura 36), sendo novamente empregados grupos com 2 fêmeas virgens com as mesmas características das que foram empregadas no teste descrito anteriormente.

**Figura 36 - Gaiola/arena empregada nos bioensaios de laboratório**



Foto: Nataly Aquino

## 6.9 Análises estatísticas

Os dados relativos aos compostos identificados nas análises químicas de seis amostras independentes, para cada população de *A. fraterculus*, foram analisadas estatisticamente. Em cada análise, a área percentual dos compostos escolhidos foi calculada e submetida à transformação logarítmica e as diferenças encontradas na composição química das amostras das populações brasileiras foram analisadas pelo método de Análise dos Componentes Principais (PCA)<sup>5</sup>.

Neste método, os dados originais representados pelo espaço dimensional K (onde K é igual ao número de variáveis) foram reduzidos para dois componentes principais, PC<sub>1</sub> e PC<sub>2</sub>. Amostras com perfis químicos semelhantes formam um único grupo e separam-se daqueles que são diferentes e as Análises de Redundância (RDA) revelam os compostos que diferenciam as populações. O software CANOCO 4.5 (Biometrics Plant Research International, The Netherlands) foi utilizado para as análises multivariadas dos dados por PCA e RDA.

Os dados dos bioensaios foram analisados primeiramente com a finalidade de verificar os pressupostos paramétricos de normalidade e homogeneidade das

<sup>5</sup> Este método tem por finalidade, a análise dos dados usados visando a redução ou eliminação de sobreposições e a escolha das formas mais representativas de dados a partir de combinações lineares das variações originais.

variâncias dos resíduos pelos testes de *Lilliefors* e *Kolmogorov-Smirnov* ( $p < 0.05$ ). Uma vez atendidos, a ANOVA foi aplicada para verificação de significância entre as diferenças.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

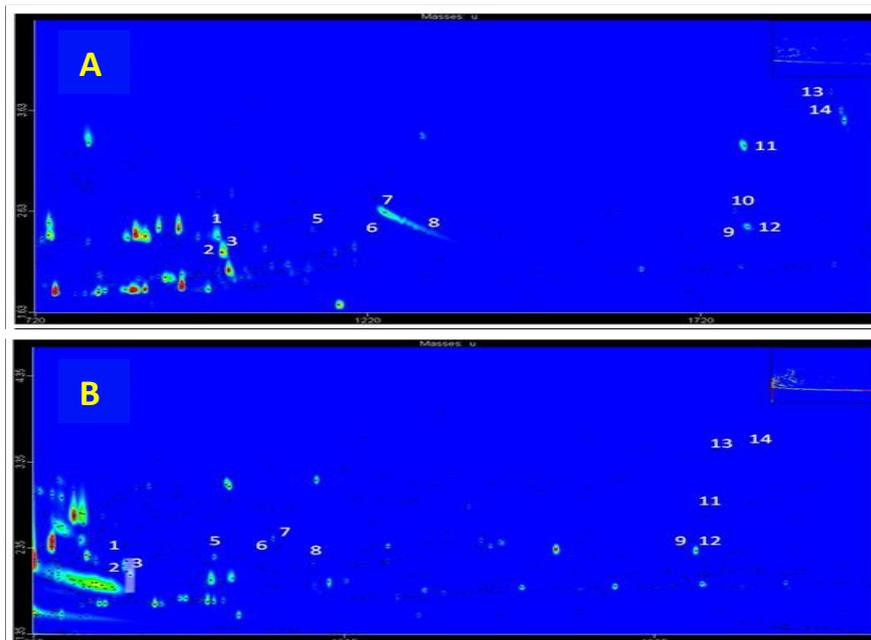
### Parte -1

Identificação da composição química do feromônio sexual liberado por machos de populações de *A. fraterculus* de diferentes localidades brasileiras, neste caso oriundas de Piracicaba – SP e de Vacaria – RS, e caracterização química das populações.

#### **7.1 Composição química dos extratos de voláteis liberados por machos de *A. fraterculus* em chamamento e caracterização das populações estudadas.**

Os extratos de machos em chamamento de *A. fraterculus*, oriundos das populações de Coruripe-AL (AL), Bento Gonçalves-RS (BEN), Pelotas-RS (PEL), Piracicaba-SP (PIR), São Joaquim-SC (SJ) e Vacaria-RS (VAC), foram submetidos a análises químicas por Cromatografia Gasosa bidimensional acoplada à Espectrometria de Massas (GCxGC-TOF-EM), sendo identificados 14 compostos comuns às misturas emanadas pelos machos, com predominância de terpenoides, álcoois e aldeídos. A Tabela 2 descreve os compostos isolados e identificados (Figura 37 e Figura 38) nas amostras de cada uma das populações e suas respectivas proporções em cada mistura.

**Figura 37 – Cromatogramas bidimensionais representativos das análises dos extratos do feromônio liberado por machos de *A. fraterculus* oriundos de Alagoas (A) e Vacaria (B).**



**Tabela 2-** Média percentual dos compostos voláteis identificados por CG x CG/TOF-EM presentes simultaneamente em extratos de machos de diferentes populações de *A. fraterculus* em chamamento.

Compostos	IR <sup>6</sup>	AL ( $\bar{x} \pm E.P.X$ )	BEN ( $\bar{x} \pm E.P.X$ )	PEL ( $\bar{x} \pm E.P.X$ )	PIR ( $\bar{x} \pm E.P.X$ )	SJ ( $\bar{x} \pm E.P.X$ )	VAC ( $\bar{x} \pm E.P.X$ )
1 <i>p</i> -Cimeno <sup>b</sup>	1022	12,19 ± 4,00	1,50 ± 1,02	35,75 ± 8,62	2,61 ± 0,62	3,71 ± 1,00	6,94 ± 1,42
2 2-Etil-1-hexanol <sup>b</sup>	1029	Tr	16,39 ± 6,58	0,34 ± 0,12	2,10 ± 0,69	0,75 ± 0,23	35,89 ± 5,59
3 Limoneno <sup>a</sup>	1041	37,79 ± 1,16	8,12 ± 0,70	28,68 ± 7,38	0,50 ± 0,07	20,30 ± 4,31	17,68 ± 2,67
4 (Z)- $\beta$ -Ocimeno <sup>a</sup>	1050	—	1,18 ± 0,81	4,71 ± 2,06	13,18 ± 0,63	5,16 ± 3,67	Tr
5 Nonanal <sup>b</sup>	1107	1,69 ± 0,68	9,74 ± 1,09	1,90 ± 0,35	2,47 ± 0,56	4,80 ± 2,54	24,65 ± 6,95
6 (Z)-3-Nonen-1-ol <sup>a,*</sup>	1159	0,45 ± 0,07	8,91 ± 0,09	Tr	0,18 ± 0,25	0,84 ± 0,40	0,23 ± 0,02
7 (E,Z)-3,6-Nonadien-1-ol <sup>a,*</sup>	1161	31,20 ± 2,78	28,48 ± 1,74	Tr	33,73 ± 5,60	13,34 ± 3,96	0,58 ± 0,06
8 Decenal <sup>b</sup>	1210	0,65 ± 0,38	2,98 ± 0,62	5,55 ± 0,93	1,18 ± 0,08	2,56 ± 1,11	6,65 ± 1,27
9 (Z,E)- $\alpha$ -Farneseno <sup>a,*</sup>	1495	0,17 ± 0,06	0,73 ± 0,38	1,39 ± 0,24	1,74 ± 0,28	3,21 ± 1,74	0,26 ± 0,05
10 Germacreno D <sup>b</sup>	1498	1,23 ± 0,42	0,37 ± 0,08	1,04 ± 0,49	0,44 ± 0,11	0,35 ± 0,06	2,24 ± 0,28
11 (E,E)-Suspensolideo <sup>a</sup>	1506	7,62 ± 1,26	9,52 ± 4,11	5,18 ± 1,41	8,93 ± 3,25	6,48 ± 0,77	0,53 ± 0,05
12 (E,E)- $\alpha$ -Farneseno <sup>a,*</sup>	1512	2,81 ± 0,20	7,39 ± 0,39	9,78 ± 2,48	27,14 ± 3,88	23,97 ± 6,79	0,89 ± 0,05
13 Anastrefina <sup>a</sup>	1617	1,85 ± 0,46	0,82 ± 0,08	1,65 ± 0,21	1,98 ± 0,49	2,93 ± 1,12	0,59 ± 0,06
14 Epianastrefina <sup>*</sup>	1621	2,35 ± 0,69	3,87 ± 1,12	4,03 ± 0,48	3,80 ± 0,28	11,59 ± 4,48	2,86 ± 0,23

<sup>a</sup> Compostos identificados por comparação com padrões sintéticos.

<sup>b</sup> Compostos identificados por comparação com as bibliotecas NIST (National Institute of Standards and Technology) e Wiley/NBS registry.

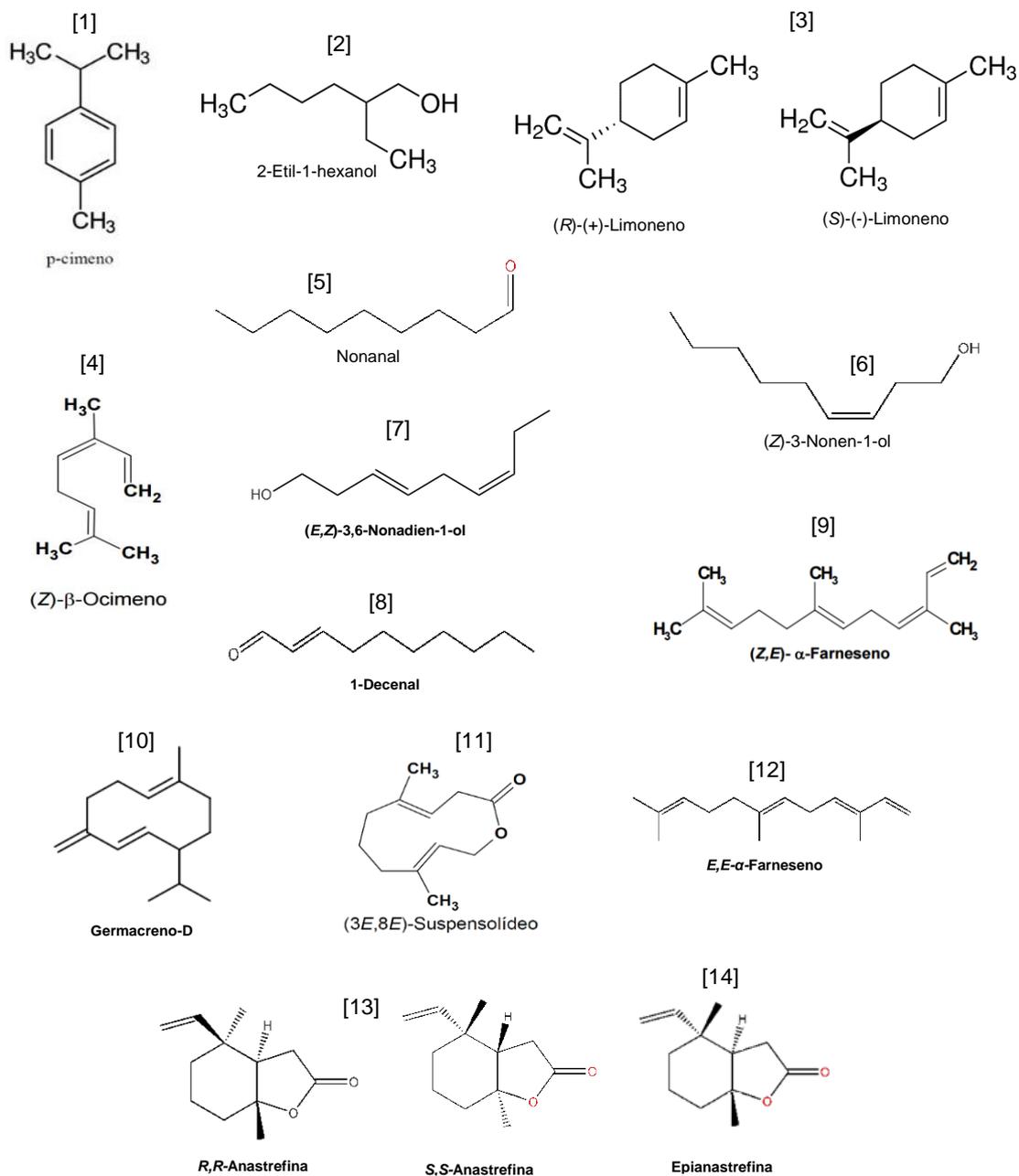
<sup>c</sup> O índice do tempo de retenção é calculado a partir dos tempos de retenção em coluna capilar DB-5.

<sup>\*</sup> Compostos com atividade eletrofisiológica identificados por GC-EAD de populações de Tucumán-Argentina (BŘIZOVA et al., 2010, 2011, VANIČKOVA et al., 2010).

Tr ≤ 0.1 % = Quantidade em traço, inferior a 0,1%

<sup>6</sup> Índice de Retenção.

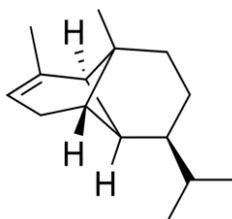
**Figura 38 – Estruturas químicas de compostos identificados em extratos de machos de *A. fraterculus***



Fonte: Obtido e adaptado de The Pherobase - Database of Pheromones and Semiochemicals, disponível em <[www.pherobase.com](http://www.pherobase.com)> e PubChem Open Chemistry Database, disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10856363#section=Top>>

O composto  $\alpha$ -copaeno (Figura 39) apesar de não ter sido detectado nos extratos de machos das populações investigadas neste estudo, tem sua presença relatada em vários estudos sobre semioquímicos de tefritídeos, a exemplo de *C. capitata* e *A. obliqua*, e em diversos frutos hospedeiros destas e de outras espécies de moscas das frutas (GONÇALVES, 2001; 2005; MALO et al, 2012; SANTOS, 2003).

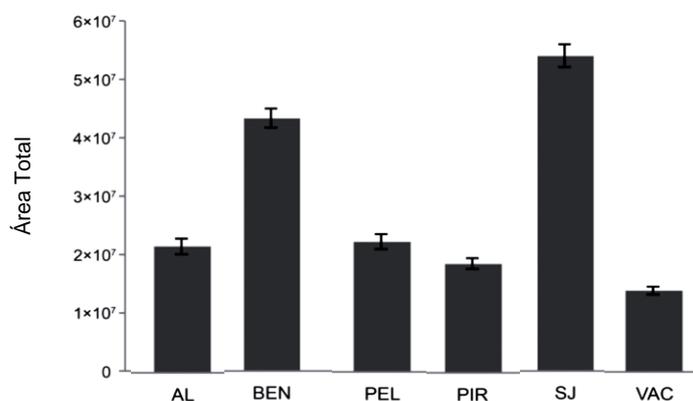
**Figura 39 – Estrutura química do  $\alpha$ -Copaeno**



Fonte: Obtido e adaptado de PubChem Open Chemistry Database, disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10856363#section=Top>>

As quantidades totais dos voláteis produzidos por machos de *A. fraterculus* variaram entre as 6 populações (Figura 40). A produção de voláteis por machos de 2 populações originárias da região Sul do Brasil (Bento Gonçalves e São Joaquim) foi em média 2.4 vezes maior do que as dos machos das demais populações avaliadas.

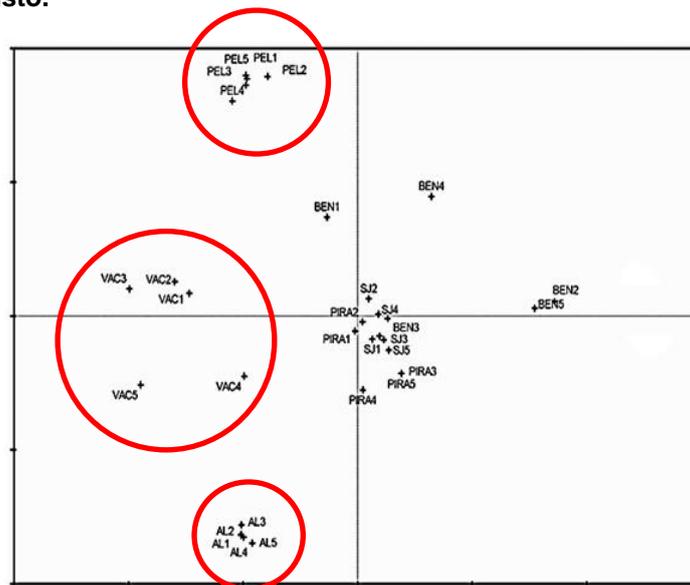
**Figura 40 - Comparação entre as áreas de abundância dos compostos voláteis coincidentes presentes nas misturas liberadas por machos de *A. fraterculus* em chamamento nas populações estudadas.**



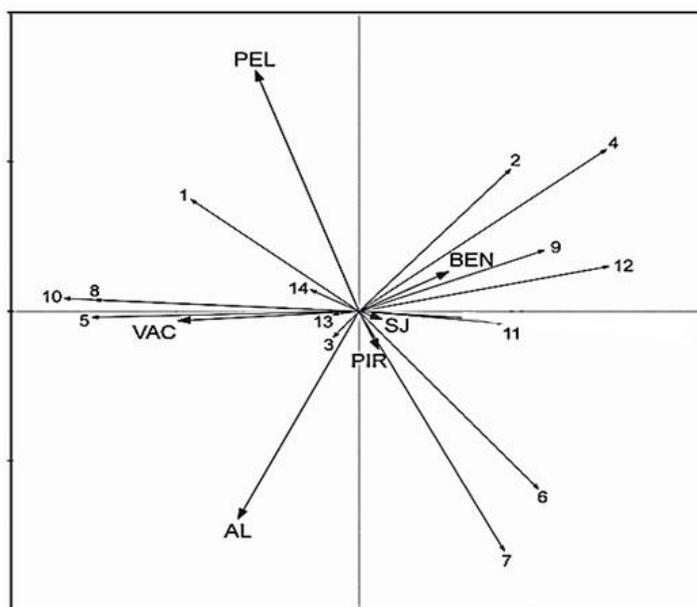
Observou-se que, embora houvesse semelhança qualitativa entre os compostos identificados nos extratos das populações estudadas, quantitativamente, houve diferenças significativas nos extratos analisados, evidenciando assim, que os insetos dessas populações, possível ou certamente sofrem interferências, tais como capacidade de síntese e/ou de liberação de determinado composto, que impactam na composição de sua mistura feromonal. Ainda que os fatores determinantes dessas interferências sejam desconhecidos para *A. fraterculus*, aspectos genéticos e ambientais combinados, a exemplo da dieta dos insetos em sua fase larval, vêm sendo atribuídos como possíveis responsáveis em diversos trabalhos por diversos autores (BŘÍZOVÁ et al, 2013).

Estes resultados demonstraram ainda que as populações de Pelotas, Vacaria e Alagoas formam grupos distintos, ao passo que as populações de Bento Gonçalves, São Joaquim e Piracicaba apresentam relativo grau de similaridade (Figura 41 e Figura 42). Dentre todas as populações comparadas, as populações de Alagoas e Pelotas são as que mais diferem das demais. Outros estudos conduzidos por DIAS, et al, (2016) apontam para indivíduos com total compatibilidade sexual baseados em análises morfométricas realizadas

**Figura 41 - Análise multivariada dos principais componentes do feromônio sexual dos machos de *A. fraterculus* das populações estudadas (AL 1-5, BEN 1-5, PEL 1-5, PIR 1-5, SJ1-5, VAC 1-5). As populações de Alagoas, Pelotas e Vacaria, compreendem de forma evidente grupos distintos. Já as populações de Piracicaba, São Joaquim e Bento Goncalves resultam num grupo misto.**



**Figura 42 – Padrão de dispersão dos compostos identificados nos feromônios liberados por machos de *A. fraterculus* de populações de Bento Gonçalves, São Joaquim e Piracicaba das de Pelotas, Vacaria e Alagoas. Enquanto a linha horizontal distingue as populações de Alagoas, Vacaria, Piracicaba e São Joaquim, das populações de Bento Gonçalves e Pelotas.**



Diferenças na composição feromonal dos machos dentro do complexo *A. fraterculus* também foram identificadas e publicadas por Lima et al. (2001) com base em população do sul do Brasil (Pelotas) mantida em laboratório e por Cáceres et al (2009) com populações de laboratório, oriundas do Peru e da Argentina.

De acordo com a literatura, a composição química de algumas misturas feromonais de insetos podem ser influenciadas por, pelo menos três fatores: genético, ambiental e alimentar. O papel dos genes em promover variações na composição de misturas do feromônio sexual de espécies muito próximas foi reportado para mariposas (LOFSTEDT et al,1991; ROELOFS & ROONEY, 2003). O efeito do ambiente na composição dos hidrocarbonetos cuticulares secretados por *Drosophila melanogaster* e empregados como feromônio sexual foi evidenciado em populações encontradas em altas e baixas altitudes (ROUAULT et al, 2004) e diferenças foram reportadas para a composição química dos hidrocarbonetos cuticulares de machos de *Drosophila serrata* alimentados com três dietas diferentes (arroz, levedura e milho) (RUNDLE, 2005).

Ainda que a existência de compatibilidade sexual entre machos e fêmeas de *A. fraterculus* provenientes de diferentes localidades do Sul do Brasil: Bento Gonçalves, São Joaquim, Pelotas e Vacaria tenha sido reportada por Dias (2012), faz-se necessária a realização de estudos comportamentais com vistas a se avaliar a atividade biológica das misturas de compostos liberadas por machos destas populações, a fim de identificar quais compostos e/ou misturas funcionam como atraentes ou repelentes para fêmeas coespecíficas e heteroespecíficas.

Recentemente Milet-Pinheiro e colaboradores (2015) demonstraram que seis compostos presentes nos extratos de machos de *A. fraterculus* eliciaram respostas eletrofisiológicas em fêmeas desta espécie. Os compostos foram identificados como sendo:  $\alpha$ -pineno, limoneno, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol, (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno e (*S,S*)-(-)-epianastrefina.

Com base nestes resultados, é possível especular que estes compostos podem estar envolvidos na atração de fêmeas das quatro populações oriundas do Sul do Brasil enquanto que a presença de uma grande quantidade dos álcoois (3*E*,6*Z*)-nonadien-1-ol, 2-etilhexan-1-ol e (3*Z*)-nonen-1-ol, como é o caso da população de Piracicaba pode ser responsável pelo diferente grau de atração exibido pelas fêmeas das populações do Sul do Brasil e isto pode explicar o grau de compatibilidade sexual reportado por Dias (2012) entre adultos de Piracicaba e Pelotas, Vacaria, Bento Gonçalves e São Joaquim.

Estudos realizados com *A. obliqua* demonstraram ainda a influência exercida pelos compostos voláteis presentes na dieta das fêmeas, em relação à receptividade e à liberação de ovos durante a oviposição (MEDEIROS-SANTANA & ZUCOLOTO, 2016) e o quanto a exposição de machos a compostos presentes no óleo essencial de gengibre afetaram a performance sexual de machos de tefritídeos de várias espécies, a exemplo de *C. capitata*, *A. ludens*, *A. obliqua* e *A. serpentina* (FLORES et al, 2011).

Nas análises químicas conduzidas neste estudo foram consideradas as semelhanças e diferenças encontradas entre as misturas feromonais liberadas por machos de diferentes populações brasileiras de *A. fraterculus*, as quais podem ser reguladas por diferentes genes que podem influenciar a maneira com qual as fêmeas destas populações respondem às misturas feromonais de machos homoespecíficos e

heteroespecíficos. Entretanto, estudos comportamentais, eletrofisiológicos e genéticos precisam ser conduzidos para corroborar ou refutar esta hipótese.

Embora se verifique que alguns compostos sejam descritos como atraentes de longa distância, os quais geralmente estão envolvidos nos encontros entre parceiros, visando o acasalamento, outras substâncias podem funcionar como atraentes de curta distância, e estas atuam como eliciadores de alterações fisiológicas e regulando os comportamentos relacionados à reprodução do inseto. A função destes compostos como atraentes de curta distância foi observada em moscas domésticas, *Musca domestica*, na mosca tsé-tsé *Glossina pallidipes* (CARLSON et al, 1984) e em *D. melanogaster* (FERVEUR, 1997; 2005; SUREAU & FERVEUR, 1999; VOSSHALL, 2008). Em estudo recente, para uma população de *A. fraterculus* proveniente de Tucumán - Argentina, observou-se que a composição química dos hidrocarbonetos cuticulares muda de acordo com o sexo e a idade de machos e fêmeas (VANÍČKOVÁ et al, 2012). Outro estudo de grande relevância caracterizou o perfil químico de morfotipos do complexo *A. fraterculus* isolando e identificando 48 hidrocarbonetos cuticulares diferentes, em machos e fêmeas deste complexo (VANÍČKOVÁ et al, 2015).

No tocante às populações brasileiras de *A. fraterculus* até então estudadas, também não há estudos comportamentais conduzidos para elucidar qual, ou quais funções os hidrocarbonetos cuticulares podem desempenhar no reconhecimento e aceitação entre indivíduos de mesma população e de populações diferentes de *A. fraterculus*. A literatura (RYAN & RAND, 1993; ENDLER & HOUDE, 1995; SMADJA & GANEM, 2002; HOHENLOHE & ARNOLD, 2010), descreve enfaticamente que o reconhecimento de parceiros pode envolver, em muitos casos, a associação de estímulos visuais, auditivos e olfativos para o desencadeamento de respostas comportamentais

Assim sendo, fatores ainda não analisados, como é o caso da influência dos hidrocarbonetos cuticulares no comportamento reprodutivo de populações brasileiras de *A. fraterculus* pertencentes a diferentes regiões geográficas, poderão contribuir futuramente com os resultados descritos neste estudo, com vistas a refinar ou potencializar a seletividade de misturas atraentes empregadas no controle desta mosca.

## Parte - 2

Emprego de formulações elaboradas com os compostos identificados e avaliação da sua eficácia quando microencapsuladas em substrato biopolímero no eliciamento de respostas de fêmeas.

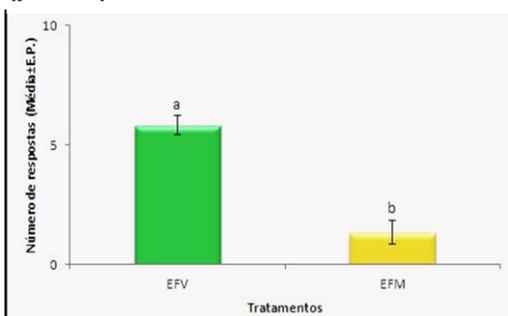
### 7.2 Bioensaios em condições de laboratório

Os bioensaios em condições de laboratório demonstraram que o padrão comportamental das fêmeas quando testadas frente aos extratos de frutos, apresenta tendência a responder positivamente em relação à fonte de odor conforme já descrito no item 6.8.

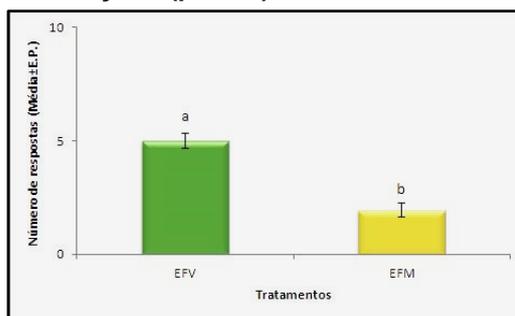
#### 7.2.1 Avaliação da preferência de fêmeas de *A. fraterculus* por extratos de frutos de goiaba em dois estágios de maturação

Este ensaio avaliou se as fêmeas de *A. fraterculus* exibiam comportamento preferencial quando submetidas a extratos obtidos a partir de frutos em diferentes estágios de maturação – Extrato de frutos verdes (EFV) / Extratos de frutos maduros (EFM). Os dados obtidos indicam que fêmeas virgens e acasaladas de *A. fraterculus* têm preferência pela composição de voláteis presentes nos extratos de frutos verdes quando comparados aos extratos dos frutos maduros, com significativa diferença estatística entre os resultados ( $p < 0.05$ ) (Figura 44 e Figura 43)

**Figura 44 - Resposta de fêmeas virgens de *A. fraterculus* para extrato do fruto em diferentes estágios de maturação.t ( $p < 0.05$ ).**



**Figura 43 - Resposta de fêmeas acasaladas de *A. fraterculus* para extrato do fruto em diferentes estágios de maturação.t ( $p < 0.05$ ).**



Segundo Macku & Jennings (1987) *apud* (OLIVEIRA, 2010), a composição e a concentração dos voláteis variam de acordo com o estágio fenológico em que os frutos se encontram, prevalecendo em cada fase de maturação destes, diferentes tipos de substâncias. Estes mesmos autores afirmam, ainda, que os frutos verdes apresentam maiores concentrações de álcoois e aldeídos de cadeia curta, enquanto que nos maduros têm-se maiores concentrações de ésteres.

De acordo com Santos (2003), os extratos de goiaba obtidos por microdestilação utilizando fragmentos de frutos, identificados por CG-EM, apresentaram em sua constituição álcoois, cetonas, alguns aldeídos, hidrocarbonetos, compostos sulfurados e principalmente ésteres, destacando-se nos frutos verdes, os terpenos e nos maduros, os ésteres alifáticos. Ainda nesse estudo, foi verificado que a resposta desses insetos aos compostos torna-se mais efetiva quando os mesmos se apresentam com estruturas menos complexas, o que ocorre nos frutos no estágio de maturação menos avançado.

Em estudos realizados por Oliveira (2010), os extratos etanólicos de maçã madura, assim como laranja madura e verde desencadearam nas fêmeas de *A. fraterculus* respostas, sem diferença significativa entre si. Ainda, conforme este autor, fêmeas em idade pré-reprodutiva e reprodutiva responderam de forma semelhante aos extratos de maçã e laranja utilizados em seus testes.

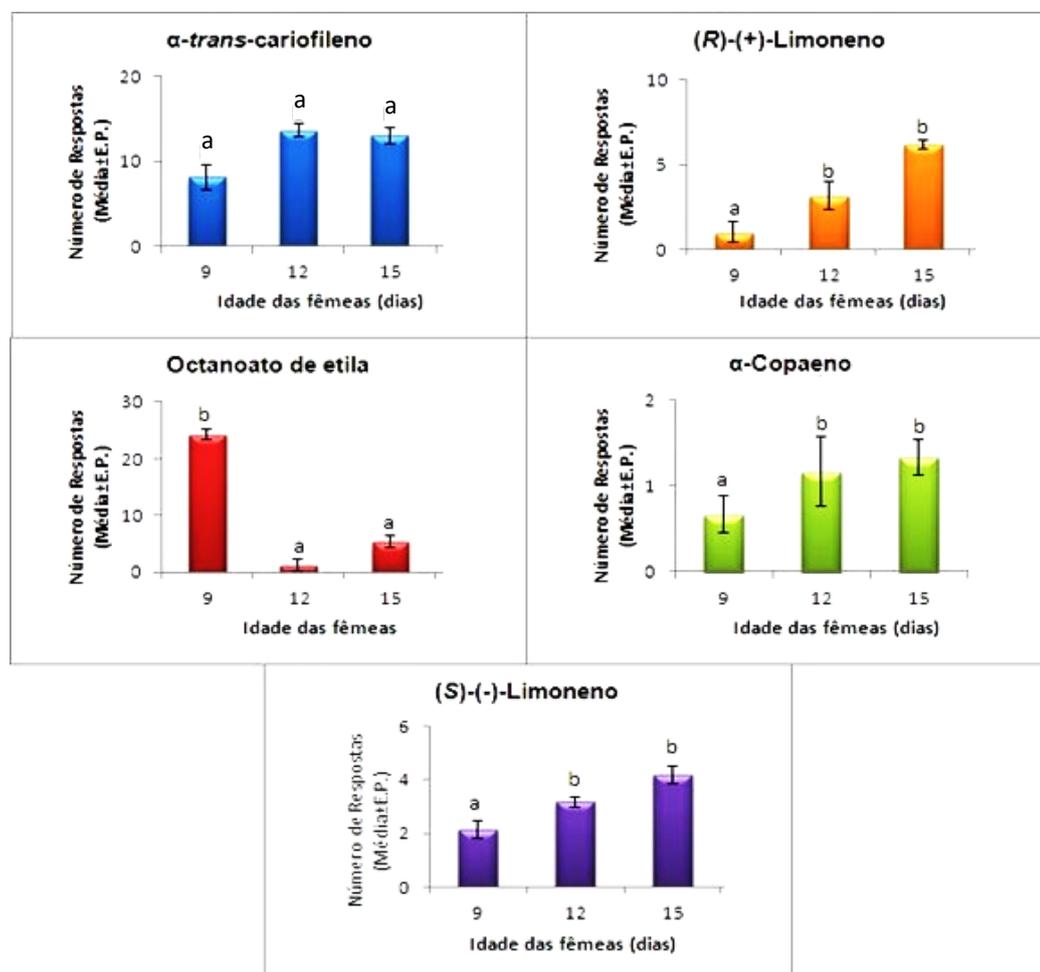
### **7.2.2 Como a idade das fêmeas influencia na resposta para soluções dos compostos sintéticos?**

Fêmeas virgens e acasaladas de *A. fraterculus* de diferentes idades quando submetidas distintamente aos testes com soluções de compostos sintéticos responderam positivamente a todas as soluções dos compostos testados, em comparação ao tratamento com hexano.

Para as fêmeas virgens, diferenças significativas foram encontradas nas respostas para as soluções testadas exceto com o  $\alpha$ -*trans*-cariofileno. As soluções dos compostos octanoato de etila, (*R*)-(+)-limoneno,  $\alpha$ -copaeno, (*S*)-(-)-limoneno não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando avaliadas as respostas dos insetos com idades entre 12 e 15 dias, porém eliciaram respostas diferindo

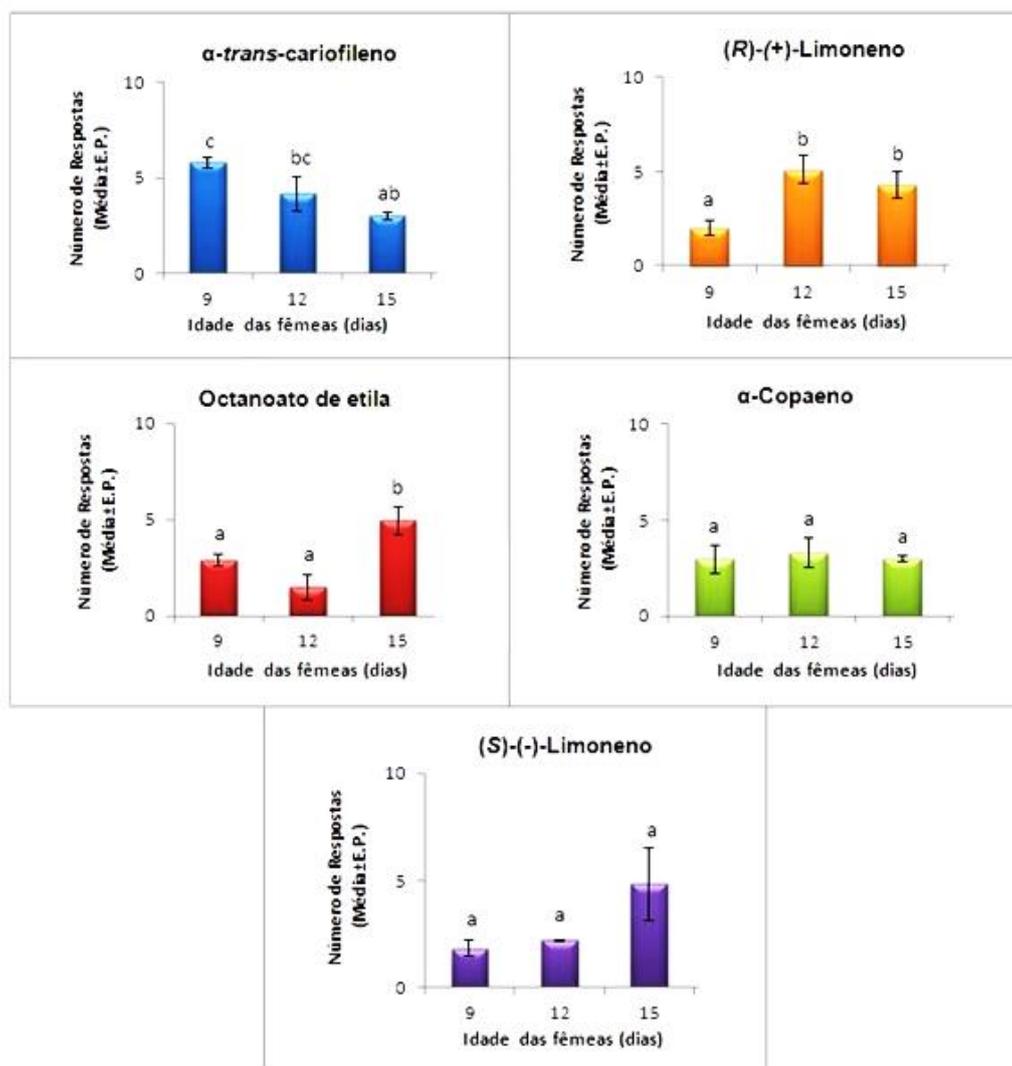
estatisticamente da idade de 9 dias, para as soluções dos compostos em questão conforme a Figura 45.

**Figura 45 - Resposta de fêmeas virgens de *A. fraterculus* de diferentes idades para as soluções dos compostos sintéticos.**



Para as fêmeas acasaladas, houve diferenças significativas nas respostas, quando estas foram expostas às soluções dos compostos  $\alpha$ -trans-cariofileno, (R)-(+)-limoneno e octanoato de etila. Para as soluções dos compostos  $\alpha$ -trans-cariofileno e (R)-(+)-limoneno, não houve diferença significativa entre as idades de 12 e 15 dias. Para a solução do composto octanoato de etila não houve diferença significativa nas respostas entre os insetos cujas idades eram de 9 e 12 dias. As soluções dos compostos  $\alpha$ -copaeno e (S)-(-)-limoneno não eliciaram respostas com diferença estatística significativa com relação às idades das fêmeas (Figura 46).

Figura 46 – Resposta de fêmeas acasaladas de *A. fraterculus* de diferentes idades para as soluções dos compostos sintéticos.



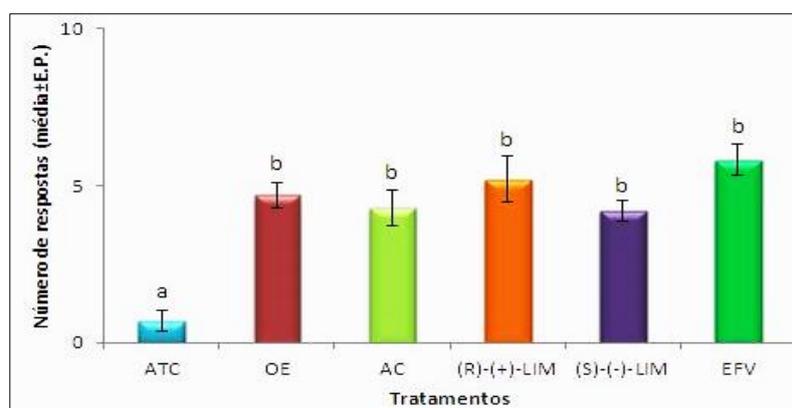
As respostas positivas relativas à atração das fêmeas avaliadas, frente aos compostos testados estão de acordo com o observado por MILET-PINHEIRO e colaboradores (2015) que verificaram a atratividade de compostos, individualmente, dentre os quais o limoneno, para essa mesma espécie de mosca. Em experimentos realizados em túnel-de-vento, fêmeas de *Bactrocera dorsalis* com até oito dias de idade foram mais atraídas do que as de 11 dias, para voláteis de mamão maduro em relação aos de outros estágios de amadurecimento (JANG & LIGHT, 1991). Machos de *B. carambolae*, com cinco dias de idade, em túnel-de-vento, não responderam ao metil eugenol, substância atraente para algumas espécies de moscas-das-frutas (WEE & TAN, 2005). Segundo esses autores, as respostas de atratividade iniciam a

partir do décimo dia e aumentam significativamente com o avanço da idade, sendo assim, podemos afirmar que os resultados obtidos foram satisfatórios, visto que a resposta apresentada pelos insetos se tornou mais pronunciada aos 15 dias de idade, motivo pelo qual se optou para comparação entre os demais tratamentos deste estudo.

### 7.2.3 Atratividade das soluções dos compostos sintéticos para fêmeas de *A. fraterculus*

Os resultados demonstraram que, com exceção da solução do composto  $\alpha$ -*trans*-cariofileno, todos os compostos foram capazes de atrair fêmeas virgens de *A. fraterculus* de forma semelhante ao que se observa para extrato do fruto verde ( $p < 0.05$ ), conforme Figura 47.

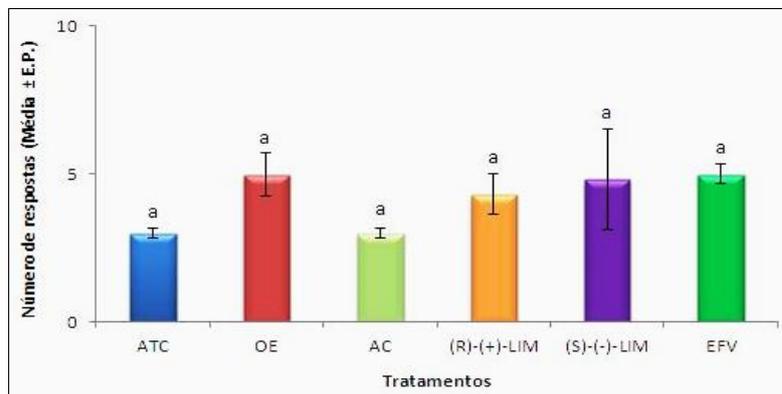
**Figura 47 – Resposta de fêmeas virgens de *A. fraterculus* para as soluções dos compostos sintéticos e extrato do fruto verde.**



\*ATC:  $\alpha$ -*trans*-cariofileno, OE: Octanoato de etila, AC:  $\alpha$ -copaeno, (R)-(+)-LIM: (R)-(+)-limoneno; (S)-(-)-LIM: (S)-(-)-limoneno e EFV: Extrato do fruto verde. ( $p < 0.05$ ).

A avaliação das respostas de fêmeas acasaladas revelou que estas também foram atraídas para o extrato do fruto verde, porém sem que houvesse significância ( $p < 0.05$ ) em comparação com as respostas para cada uma das soluções dos compostos sintéticos testados (Figura 48).

**Figura 48 – Resposta de fêmeas acasaladas de *A. fraterculus* para as soluções dos compostos sintéticos e extrato do fruto verde.**



\*ATC:  $\alpha$ -trans-cariofileno, OE: Octanoato de etila, AC:  $\alpha$ -copaeno, (R)-(+)-LIM: (R)-(+)-limoneno; (S)-(-)-LIM: (S)-(-)-limoneno e EFV: Extrato do fruto verde. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey Post-Hoc HSD ( $p < 0.05$ ).

## 7.2.4 Influência da concentração dos compostos na atração de fêmeas de *A. fraterculus*

Os dados da Tabela 3 e da Tabela 4 demonstram que fêmeas virgens e acasaladas de *A. fraterculus* em idades de 9, 12 e 15 dias, responderam para todas as concentrações das soluções dos compostos sintéticos testados independentemente da idade. Apesar disso, foi possível verificar diferenças significativas para soluções contendo menores concentrações dos compostos testados com melhor resposta para as concentrações de 0,1  $\mu\text{L/mL}$  e 1,0  $\mu\text{L/mL}$ .

**Tabela 3- Resposta de atração de fêmeas virgens de *A. fraterculus* em diferentes idades para as soluções dos compostos sintéticos em diferentes concentrações e quando comparados ao tratamento com hexano.**

COMPOSTOS**	CONCENTRAÇÕES ( $\mu\text{L/mL}$ ) - (Média de respostas dos insetos $\pm$ E.P.)*		
	0,1	1,0	10,0
ATC – 9	8,17 $\pm$ 1,47 <sup>b</sup>	14,83 $\pm$ 0,95 <sup>c</sup>	2,3 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>
ATC – 12	13,67 $\pm$ 0,84 <sup>b</sup>	17,83 $\pm$ 1,07 <sup>c</sup>	2,83 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>
ATC – 15	13,00 $\pm$ 1,03 <sup>c</sup>	0,67 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	3,83 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>
OE – 9	24,17 $\pm$ 1,49 <sup>b</sup>	4,50 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	3,50 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
OE – 12	1,17 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	5,33 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	0,83 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>
OE – 15	5,33 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	4,67 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup>	2,83 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>
AC – 9	0,67 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	4,00 $\pm$ 0,51 <sup>b</sup>	0,33 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>
AC – 12	1,17 $\pm$ 0,40 <sup>ab</sup>	2,00 $\pm$ 0,51 <sup>b</sup>	0,17 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>
AC – 15	1,33 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	4,33 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>	0,50 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
(R)-(+)-LIM – 9	6,17 $\pm$ 0,60 <sup>b</sup>	5,50 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup>	1,17 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>
(R)-(+)-LIM – 12	3,17 $\pm$ 0,83 <sup>b</sup>	2,83 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup>	0,50 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
(R)-(+)-LIM – 15	1,00 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	5,83 $\pm$ 0,74 <sup>b</sup>	0,33 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>
(S)-(-)-LIM – 9	2,17 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	2,12 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	2,00 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
(S)-(-)-LIM – 12	3,18 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	2,70 $\pm$ 0,34 <sup>b</sup>	1,00 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>
(S)-(-)-LIM – 15	4,20 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	3,11 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup>	0,23 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>

ATC:  $\alpha$ -trans-cariofileno; OE: Octanoato de etila; AC:  $\alpha$ -copaeno; (R)-(+)-LIM: (R)-(+)-limoneno; (S)-(-)-LIM: (S)-(-)-limoneno. 9,12,15: idade das fêmeas (dias).

**Tabela 4 - Resposta de atração de fêmeas acasaladas de *A. fraterculus* para as soluções dos compostos sintéticos em diferentes concentrações e quando comparados ao tratamento com hexano.**

CONCENTRAÇÕES (µL/mL) - (Média de respostas dos insetos ±E.P.)*			
COMPOSTOS**	0,1	1,0	10,0
ATC – 9	5,83 ± 0,28 <sup>b</sup>	2,17 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,67 ± 0,56 <sup>b</sup>
ATC – 12	4,17 ± 0,90 <sup>a</sup>	3,90 ± 0,73 <sup>a</sup>	4,83 ± 1,04 <sup>a</sup>
ATC – 15	3,00 ± 0,18 <sup>b</sup>	1,17 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,67 ± 0,56 <sup>b</sup>
OE – 9	2,90 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,93 ± 0,87 <sup>a</sup>	3,50 ± 0,48 <sup>a</sup>
OE – 12	1,50 ± 0,66 <sup>a</sup>	2,22 ± 0,62 <sup>a</sup>	3,93 ± 1,29 <sup>a</sup>
OE – 15	5,00 ± 0,73 <sup>a</sup>	5,17 ± 0,64 <sup>a</sup>	4,83 ± 0,38 <sup>a</sup>
AC – 9	3,00 ± 0,73 <sup>a</sup>	2,33 ± 0,92 <sup>a</sup>	3,67 ± 1,38 <sup>a</sup>
AC – 12	3,33 ± 0,76 <sup>a</sup>	3,17 ± 0,59 <sup>a</sup>	4,50 ± 1,11 <sup>a</sup>
AC – 15	3,00 ± 0,18 <sup>b</sup>	2,60 ± 0,19 <sup>b</sup>	1,50 ± 0,32 <sup>a</sup>
(R)-(+)-LIM – 9	2,00 ± 0,36 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,36 <sup>a</sup>	4,33 ± 0,85 <sup>b</sup>
(R)-(+)-LIM – 12	5,10 ± 0,73 <sup>a</sup>	4,23 ± 0,96 <sup>a</sup>	4,20 ± 0,68 <sup>a</sup>
(R)-(+)-LIM – 15	4,33 ± 0,69 <sup>b</sup>	3,33 ± 0,21 <sup>ab</sup>	2,33 ± 0,21 <sup>a</sup>
(S)-(-)-LIM – 9	1,83 ± 0,38 <sup>a</sup>	7,67 ± 0,56 <sup>b</sup>	3,27 ± 0,09 <sup>a</sup>
(S)-(-)-LIM – 12	2,20 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,50 ± 0,18 <sup>a</sup>	3,23 ± 0,15 <sup>c</sup>
(S)-(-)-LIM – 15	4,83 ± 1,70 <sup>a</sup>	5,67 ± 0,94 <sup>a</sup>	8,17 ± 0,82 <sup>a</sup>

ATC:  $\alpha$ -trans-cariofileno; OE: Octanoato de etila; AC:  $\alpha$ -copaeno; (R)-(+)-LIM: (R)-(+)-limoneno; (S)-(-)-LIM: (S)-(-)-limoneno. 9,12,15: idade das fêmeas (dias).

Na análise dos resultados referentes às respostas observadas em fêmeas virgens e também entre as acasaladas, nota-se que estas quando expostas às soluções de  $\alpha$ -trans-cariofileno e octanoato de etila nas concentrações de 0,1 e 1,0 µL/mL expressaram as maiores médias de respostas frente a quaisquer outros compostos, e em relação à concentração de 10,0 µL/mL, demonstrando ser estes compostos nas menores concentrações, os potencialmente mais eficazes para a atração dessas fêmeas, principalmente as virgens. Quanto às fêmeas acasaladas, aquelas com 15 dias de idade manifestaram a melhor média de respostas quando submetidas ao ensaio com o isômero S do limoneno mostrou ser o composto mais eficaz.

Estudos baseados em ensaios comportamentais, mostraram que fêmeas de *A. suspensa* imaturas e maduras foram atraídas pela amônia frente a duas substâncias atraentes (amônia e dióxido de carbono) (KENDRA et al, 2005). Os autores também observaram que a elevação da concentração de amônia tornou o composto menos atraente, podendo o mesmo ter efeito de repelência para as moscas. Esse estudo corrobora os resultados obtidos para a escolha das menores concentrações das soluções dos compostos sintéticos testados, independentemente do status da fêmea, podendo ser explicada pelo fato de que, em altas concentrações,

as sensilas olfativas dos insetos tornam-se totalmente saturadas pelo composto, tornando o composto menos atrativo quando sua concentração é aumentada (GULLAN & CRANSTON, 1996).

Em 2011, Niogret e colaboradores conduziram relevante estudo no qual avaliaram a composição dos constituintes voláteis de cascas de árvores de Abacate - *Persea americana* Nill (Lauraceae), Lichia – *Litchi chinensis* Sonn (Salpindaceae) e de Ficus – *Ficus benjamina* L. (Moraceae), e identificaram o  $\alpha$ -copaeno e o  $\beta$ -cariofileno como os dois componentes mais abundantes, de um total de treze, na mistura dos constituintes voláteis presentes nas amostras obtidas. Os autores realizaram em seguida testes em eletroantenoógrafo e constataram intensa atividade eletrofisiológica provocada pelo  $\alpha$ -copaeno em machos estéreis de *C. capitata*, espécie de mosca-das-frutas considerada a mais polífaga entre os tefritídeos.

### 7.2.5 Avaliação das respostas de fêmeas às misturas das soluções dos compostos

Após serem avaliadas as respostas das fêmeas quando submetidas aos compostos isolados, procedeu-se a realização dos bioensaios aplicando-se como tratamentos misturas dos compostos ora avaliados isoladamente.

Os resultados dispostos nas Tabela 5 e Tabela 6 demonstram que fêmeas virgens e acasaladas de *A. fraterculus* responderam para todas as misturas das soluções dos compostos sintéticos testados.

**Tabela 5 - Respostas de fêmeas virgens de *A. fraterculus* para as misturas das soluções dos compostos sintéticos.**

IDADE	MISTURAS DAS SOLUÇÕES DOS COMPOSTOS (Média±E.P.)*					
	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
9 dias	1,70±0,56 <sup>ab</sup>	1,00±0,36 <sup>a</sup>	1,50±0,32 <sup>ab</sup>	6,33±1,70 <sup>c</sup>	5,33±0,21 <sup>bc</sup>	5,00 ± 1,32 <sup>bc</sup>
12 dias	1,50±0,18 <sup>a</sup>	1,33±0,21 <sup>a</sup>	1,83±0,28 <sup>a</sup>	4,50±0,63 <sup>bc</sup>	2,67±0,21 <sup>ab</sup>	5,67 ± 1,07 <sup>c</sup>
15 dias	2,17±0,46 <sup>a</sup>	1,67±0,21 <sup>a</sup>	4,50±0,66 <sup>ab</sup>	3,07 ± 1,19 <sup>a</sup>	4,07±0,77 <sup>a</sup>	7,50 ± 0,48 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey Post-Hoc HSD (p<0.05).

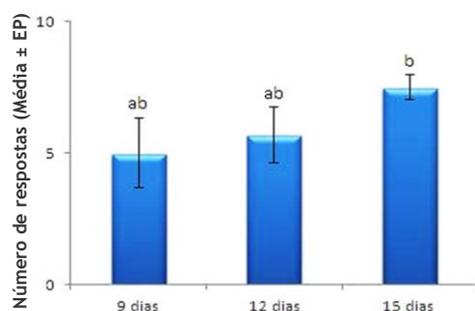
**Tabela 6 - Respostas de fêmeas acasaladas de *A. fraterculus* para as misturas das soluções dos compostos sintéticos.**

IDADE	MISTURAS DAS SOLUÇÕES DOS COMPOSTOS (Média±E.P.) <sup>a</sup>					
	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
9 dias	1,83±0,38 <sup>a</sup>	2,07±0,47 <sup>a</sup>	3,83±1,32 <sup>a</sup>	4,50±0,84 <sup>a</sup>	2,17±0,10 <sup>a</sup>	3,37±0,37 <sup>a</sup>
12 dias	1,67±0,42 <sup>a</sup>	1,33±0,10 <sup>a</sup>	1,67±0,21 <sup>a</sup>	3,00±0,63 <sup>ab</sup>	3,83±0,10 <sup>ab</sup>	5,00±1,59 <sup>b</sup>
15 dias	0,33±0,21 <sup>a</sup>	1,67±0,21 <sup>bc</sup>	2,83±0,45 <sup>c</sup>	1,00±0,36 <sup>ab</sup>	4,33±0,21 <sup>b</sup>	1,83±0,15 <sup>bc</sup>

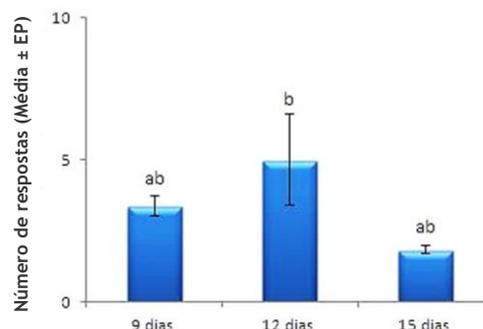
<sup>a</sup>Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística significativa pelo teste de *Tukey Post-Hoc HSD* ( $p < 0.05$ ).

No entanto, essas fêmeas apresentaram melhores respostas para as misturas de menor concentração dos quatro compostos ((S)-(–)-limoneno,  $\alpha$ -trans-cariofileno,  $\alpha$ -copaeno e octanoato de etila) que haviam sido encontrados nos extratos de goiaba (Figura 49 e Figura 50).

**Figura 49 - Resposta de fêmeas virgens de *A. fraterculus* de diferentes idades para a mistura M6 ((S)-(–)-limoneno,  $\alpha$ -trans-cariofileno,  $\alpha$ -copaeno, octanoato de etila) na concentração 0,1  $\mu$ L/mL).**



**Figura 50 - Resposta de fêmeas acasaladas de *A. fraterculus* de diferentes idades para a mistura M6 ((S)-(–)-limoneno,  $\alpha$ -trans-cariofileno,  $\alpha$ -copaeno, octanoato de etila) na concentração 0,1  $\mu$ L/mL).**



Ao avaliar a seletividade das antenas de fêmeas e machos de *A. fraterculus* Oliveira (2010), demonstrou que tanto em estágio pré-reprodutivo quanto pós-reprodutivo machos e fêmeas responderam aos compostos (*E*)-3-hexen-1-ol, 3-butirato de etila, acetato de hexila, hexanoato de etila, (*Z*)-3-butirato de hexila, octanoato de etila isolados ou em mistura. Em bioensaios conduzidos em túnel-de-vento, fêmeas de *A. ludens* apresentaram as melhores respostas para os extratos de goiaba (CRUZ-LÓPEZ et al., 2005). Esses resultados corroboram os obtidos no presente estudo, uma vez que as fêmeas de *A. fraterculus* responderam às soluções dos compostos sintéticos e também ao extrato do fruto, o qual contém as mesmas substâncias, tratando-se, no entanto, de uma mistura.

De acordo com Oliveira (2010), em ensaios de eletroantenografia realizados com adultos de *A. fraterculus* as melhores respostas eletrofisiológicas foram obtidas quando as substâncias (*E*)-3-hexen-1-ol e (*Z*)-3-butirato de hexila fizeram parte da mistura desses compostos, em comparação com os compostos isolados. O mesmo ainda concluiu que todas as misturas usadas nos testes apresentaram as maiores respostas, comprovando com isso um efeito aditivo das combinações usadas, sendo o tipo de mistura e a proporção, fatores que contribuem para a obtenção das melhores respostas por parte dos insetos.

Cruz-López et al (2006), constataram em campo e em túnel-de-vento, que machos e fêmeas de *A. obliqua* foram mais atraídos por uma mistura de nove compostos encontrados no extrato de cajá, *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae), do que para proteína hidrolisada e água utilizados no experimento. De maneira análoga, Malo et al (2012) relataram também para *A. obliqua* a ocorrência de maior atração de machos e fêmeas por uma mistura de três compostos sintéticos (mirceno,  $\alpha$ -pineno, e *trans*- $\beta$ -ocimeno), em mesma proporção à encontrada em extratos de manga, frente ao próprio extrato do fruto. O mesmo estudo evidenciou que quando a mistura dos mesmos três compostos em proporção de 1:1:1 é utilizada, frente ao extrato dos frutos de goiaba, os insetos não apresentaram preferência significativa pela mistura ou pelo extrato, demonstrando desta forma que os compostos sintéticos empregados eram capazes de eliciar comportamentos em níveis semelhantes provocados pelos extratos dos frutos.

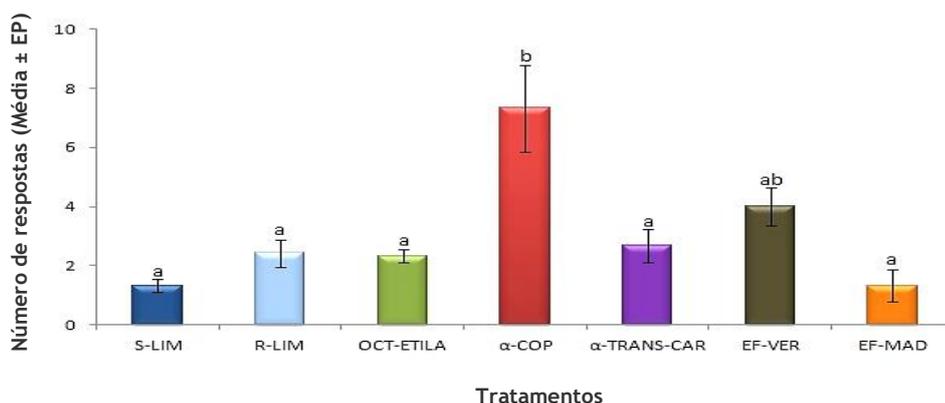
A exposição a voláteis da goiaba aumentou o sucesso dos machos no acasalamento e afetou positivamente o comportamento e a performance de chamamento, além da liberação de feromônio durante ensaios de com populações de *A. fraterculus* de laboratório e machos selvagens. Mudanças no comportamento dos machos de *A. fraterculus* parecem ser particularmente importantes durante a fase inicial do período de atividade sexual, quando a maioria dos pares de acasalamento são formados. Exposição de machos de laboratório a certos compostos ou grupos de compostos voláteis de identificados em goiabas podem melhorar o sucesso do acasalamento (BACHMANN et al, 2015)

## 7.2.6 Respostas de fêmeas de *A. fraterculus* em bioensaios utilizando biopolímero como substrato

A avaliação de um substrato que possa promover maior tempo de dispersão dos compostos definidos como bons atraentes consiste em aspecto relevante na busca de uma isca eficaz e que justifique seu custo benefício ao agricultor, visto que por mais que possa ser atrativa ao inseto alvo, uma formulação que tenha meia-vida reduzida quando colocada nas armadilhas, demandará uma dispendiosa e inconveniente necessidade de reposição dessas iscas.

Inicialmente foram avaliadas as respostas decorrentes da exposição das fêmeas a soluções dos compostos isolados em substrato de biopolímero. Os resultados obtidos a partir destes bioensaios revelaram efetiva atração das fêmeas pelo  $\alpha$ -copaeno, com expressiva diferença significativa entre os demais compostos sintéticos, mas diferindo estatisticamente do extrato dos frutos de goiaba em estágio verde (Figura 51), cuja capacidade de eliciar respostas nas fêmeas já foi evidenciada em testes já descritos neste trabalho.

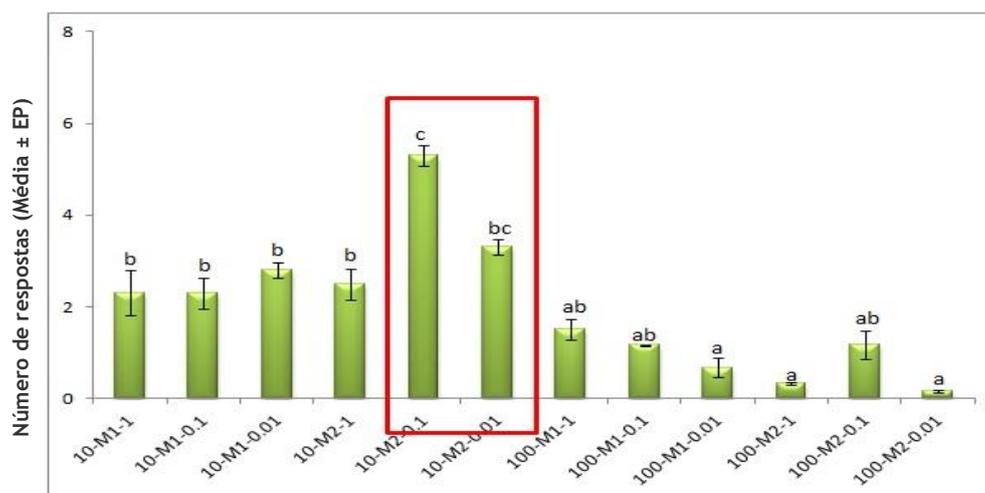
**Figura 51- Respostas de atratividade, para fêmeas de *A. fraterculus*, de compostos microencapsulados em biopolímero: (S)-(-)-limoneno, (R)-(+)-limoneno, Octanoato de etila,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -trans-cariofileno e extratos de frutos verdes e maduros**



Já quando foram empregadas as misturas sintéticas formuladas com base na identificação dos compostos que compõem as misturas do que é liberado pelos frutos de goiaba, o hospedeiro preferencial de *A. fraterculus*, estas responderam a todas as concentrações testadas das misturas de compostos microencapsulados, destacando-se enfaticamente a resposta à mistura 10-M2-0,1 [(R)-(+)-limoneno; octanoato de etila;  $\alpha$ -copaeno e  $\alpha$ -trans-cariofileno] (Figura 52). Além disso, diferenças significativas

( $p < 0.05$ ) também foram encontradas, para a solução da mistura M1 [(S)-(-)-limoneno; octanoato de etila;  $\alpha$ -copaeno e  $\alpha$ -*trans*-cariofileno] quando 10 $\mu$ L da mistura foram impregnados em 0.1mg de biopolímero, resultando em uma formulação com concentração de 0.1 $\mu$ g/mL, a qual não diferiu, em resposta da formulação com concentração de 0.01 $\mu$ g/mL.

**Figura 52- Resposta comportamental de fêmeas de *A. fraterculus* expostas a misturas: M1- (S)-limoneno; octanoato de etila;  $\alpha$ -copaeno e  $\alpha$ -*trans*-cariofileno e M2- (R)-limoneno; octanoato de etila;  $\alpha$ -copaeno e  $\alpha$ -*trans*-cariofileno.**



A utilização de biopolímero neste estudo está em consonância com WELLS & SINCLAIR (1973) apud NANDAGOPAL et al (2015) os quais propuseram pela primeira vez a utilização de polímeros de ácido láctico e glicólico degradáveis como matrizes para a liberação sustentada de substâncias bioativas, em face aos potenciais benefícios de sua utilização. Outras vantagens dos polímeros para esta finalidade são ainda consideradas, e dentre elas está a característica da matriz polimérica ser biodegradável, não ocasionando portanto o acúmulo de resíduos no ambiente.

Os resultados obtidos neste ensaio corroboram ainda com os obtidos por NIOGRET et al. (2011) em relação aos compostos identificados nas amostras de abacate, lichia, e fícus, bem como as respostas de machos de *C. capitata* frente aos extratos.

Devido à alta volatilidade destes compostos, o substrato de liberação dos mesmos deve possibilitar seu uso por períodos prolongados em condições de campo. Neste sentido, a microencapsulação em biopolímero protege os compostos das condições ambientais (JANSSON-CHARRIER, 1996). Assim, a formulação

microencapsulada dos compostos identificados nos frutos hospedeiros, potencialmente possibilitará seu uso em campo, sob a forma de iscas olfativas contidas em armadilhas atraentes para a praga, de modo que se possa observar a dispersão dos compostos por um tempo mais prolongado e promovendo o seu controle de maneira efetiva e ecológica.

Os resultados sinalizam para a utilização promissora dessas misturas como iscas atraentes para uso nos pomares. As misturas sintéticas atraíram mais fêmeas que o tratamento controle (hexano) e demonstram ser potencialmente mais efetivas na captura de fêmeas do que o extrato de aeração dos frutos de goiaba verdes.

Estudos complementares ainda deverão ser realizados, com a finalidade de se avaliar o grau de eficácia do uso do biopolímero em campo, para posterior padronização e comercialização do mesmo, como componente de iscas a serem empregadas no monitoramento das culturas e o respectivo controle da infestação por moscas-das-frutas em pomares.

## 7 CONCLUSÕES

- ✓ Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que há diferenças significativas na composição química do feromônio sexual liberados por machos das diferentes populações de *A. fraterculus* estudadas, caracterizando e corroborando desta forma evidências de isolamento reprodutivo e de especiação entre indivíduos de diferentes morfotipos, de regiões distintas;
- ✓ Determinados compostos identificados nos extratos de frutos de goiaba eliciaram atividades comportamentais em fêmeas, uma vez que as fêmeas desta espécie se mostraram atraídas por compostos que também foram identificados compondo a mistura liberada por machos em chamamento e que foram utilizados de forma individualizada ou integrando misturas com proporções definidas.
- ✓ Compostos como o (*R*)-(+)-limoneno, octanoato de etila e principalmente  $\alpha$ -copaeno, quando utilizados individualmente, mostraram-se capazes de atrair de forma significativa fêmeas de *A. fraterculus*. Estes mesmos três compostos adicionados do  $\alpha$ -*trans*-cariofileno, integrando uma mistura com concentração de 10 $\mu$ L da mistura em substrato biopolimérico retratam o potencial de atração desta mistura, ainda que sejam utilizadas pequenas concentrações dos compostos.
- ✓ Os resultados obtidos nos ensaios com substrato de biopolímero evidenciam perspectivas promissoras para utilização desta matriz na formulação de iscas atraentes para os insetos estudados.
- ✓ Novas etapas em estudos futuros devem ser desenvolvidas, a exemplo dos ensaios em semi-condições de campo e de campo, bem como a avaliação da dispersão residual temporal dos compostos no biopolímero, para estimar a vida útil das iscas no ambiente, completando-se desta forma todas as etapas necessárias à caracterização de formulações com potencial de

produção e oferta aos mercados produtores de frutas que são atacadas por moscas da espécie aqui estudada.

## 8 PERSPECTIVAS

- i. A pesquisa voltada à identificação de formulações viáveis e eficazes para o emprego nas culturas, como explicitado anteriormente, baseia-se na identificação de compostos que apresentem atividade de estímulo sensorial para os insetos e a caracterização da mistura que possivelmente comporá iscas que deverão ser empregadas nos testes de laboratório e por fim, nos pomares nos quais se pretende realizar o monitoramento ou controle da praga em questão.
  
- ii. A prospecção de produtos que sejam eficazes e seguros, destinados ao emprego na agricultura, fundamenta o interesse de diversos grupos de pesquisa por todo o mundo para essa questão, e o que se espera é que o emprego de produtos de caráter seletivo, quanto à atração de insetos-praga, possa refletir na redução e otimização dos custos para o controle de moscas-das-frutas, e principalmente na garantia da qualidade dos frutos que se pretende comercializar.
  
- iii. Portanto, levando-se em conta a realização de todas as etapas que usualmente estão relacionadas à pesquisa de semioquímicos com o intuito de se obter misturas atraentes aos insetos, a pesquisa de semioquímicos destinados ao controle de pragas deve seguir um roteiro que abranja a correta identificação das espécies de interesse, dos compostos que supostamente estejam atuando na comunicação entre esses insetos e por fim, também a formulação de iscas para o emprego destas nas lavouras.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALUJA, M. BIRKE, A.. Habitat Use by Adults of *Anastrepha obliqua* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) in a Mixed Mango and Tropical Plum Orchard. **Annals of the Entomological Society of America** 86(6):799-812. 1993.

AZEVEDO, F. R.; SANTOS, C. A. M.; NERE, D. R.; MOURA, E. S., AZEVEDO, R.. Influência da Cor e Forma dos Frutos Artificiais e Quadrantes da Copa da Goiabeira sobre a Atração de *Anastrepha* Spp. para Oviposição. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**. V.23, n.1, p.34-45, jun.. 2013.

BACHMANN, G. E.; SEGURA, D. F.; DEVESCOVI, F.; JUÁREZ, M. L.; RUIZ, M. J.; VERA, M. T.; CLADERA, J. L.; TEAL, P. E. A.; FERNÁNDEZ, P. C.. Male Sexual Behavior and Pheromone Emission Is Enhanced by Exposure to Guava Fruit Volatiles in *Anastrepha fraterculus*. **PLoS ONE** 10(4): 1-17. 2015.

BARRIOS-SAN MARTÍN, J.; QUIROZ, A.; VERDUGO, J. A.; PARRA, L.; HORMAZABAL, E.; ASTUDILLO, L. A.; ROJAS-HERRERA, M.; RAMÍREZ, C. C.. Aphid *Chaitophorus leucomelas* (STERNORRHYNCHA: APHIDIDAE) on Two Poplar Hybrids With Contrasting Susceptibility to Aphids. **Journal of Economic Entomology**, 107 (1): 268-276. 2014.

BIRKE, A.; GUILLÉN, L.; MIDGARDEN, D.; et al. . Fruit flies, *Anastrepha ludens* (Loew), *A. obliqua* (Macquart) and *A. grandis* (Macquart) (DIPTERA: TEPHRITIDAE): three pestiferous tropical fruit flies that could potentially expand their range to temperate áreas. In PEÑA, 2013. **Potential invasive pests of agricultural crops**. Boca Raton: CABI Intl. 2013.

BISOGNIN, M.; NAVA, D. E.; LISBÔA H.; BISOGNIN, A. Z.; GARCIA, M. S.; VALGAS, R. A.; DIEZ-RODRIGUEZ, G. I.; BOTTON M.; ANTUNES, L. E.C.. Biologia da mosca-das-frutas sul-americana em frutos de mirtilo, amoreira- preta, araçazeiro e pitangueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.48, n.2, p.141-147, fev. 2013.

BRAGA SOBRINHO, R.; MALAVASI, A.; MESQUITA, A. L. M.; OMETO, A. C. F. Manual operacional para levantamento, detecção, monitoramento e controle de moscas-das-frutas. Fortaleza - CE: **Embrapa Agroindústria Tropical**, p. 29, 2001.

BRASIL. **Decreto Lei nº 2.848, de 07 de Dezembro de 1940**. Código Penal Brasileiro. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 31 Dez. 1940. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto-lei/Del2848compilado.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/Del2848compilado.htm)>. Acesso em: 20 jan. 2017.

BRASIL. **Instrução Normativa 24**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. Publicado em 09 set. 2015.

BRASIL. **Relações Internacionais.** Negociações não-tarifárias multilaterais. 2017. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/relacoes-internacionais/negociacoes-nao-tarifarias/multilaterais>>. Acesso em: 10 set. 2017.

BŘÍZOVÁ, R.; MENDONÇA, A. L.; VANÍČKOVÁ, L.; LIMA-MENDONÇA, A., DA SILVA, C. E.; TOMČALA, A.; PARANHOS, B.A.J.; DIAS, V. S.; JOACHIM-BRAVO, I. S.; HOSKOVEC, M.; KALINOVÁ, B.; DO NASCIMENTO, R. R.. Pheromone analyses of the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex. **Florida Entomologist**. 96: 1107-1115. 2013.

CÁCERES, C; SEGURA, D. F.; VERA, M. T.; WORNOPYORN, V.; CLADERA, J. L.; TEAL, P.; SAPOUNTZIS, P.; BOURTZIS, P.; ZACHAROPOULOU, A.; ROBINSON. A. S.; Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera; Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology. **Biol J Linn Soc** 97: 152-165. 2009.

CANALE, A.; GERMINARA, S. G.; CARPITA, A.; BENELLI, G.; BONSIGNORI, G.; STEFANINI C.; RASPI, A.; ROTUNDO, G.. Behavioural and electrophysiological responses of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (DIPTERA: TEPHRITIDAE), to male- and female-borne sex attractants. **Chemoecology** 23:155–164. 2013.

CARVALHO, J. PA.; JESUS-BARROS, C. R.; BARIANI, A.; LIMA, A. L.; MACHOTA JUNIOR, R.; BOTTON, M.. Avaliação do atrativo alimentar CeraTrap® como alternativa para o monitoramento de *Bactrocera carambolae*. **Embrapa – Jornada Científica**. 2016.

CARVALHO, R. S.. **Biocontrole de moscas-das-frutas: histórico, conceitos e estratégias**. 1. ed. Circular Técnica, 83. Cruz das Almas – BA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

CENTRE FOR THE PROMOTION OF IMPORTS. **What requirements should your product comply with?** Market Information - Fresh Fruit and Vegetables. Disponível em <<https://www.cbi.eu/market-information/fresh-fruit-vegetables/buyer-requirements/>>. Acesso em: 13 out. 2017.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA). **Balanco 2016 | Perspectivas 2017**. Fruticultura. Cap 09. Disponível em: <[http://www.cnabrasil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/balanco\\_2016\\_perspectivas2017\\_web.pdf](http://www.cnabrasil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/balanco_2016_perspectivas2017_web.pdf)>. Acesso em: 12 ago. 2017.

CORRÊA, A. G.; SANT'ANA, J. Fundamentos da comunicação química de insetos In: FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. Produtos naturais no controle de insetos. São Carlos: **EdUFSCAR**,. Série de textos da escola de verão em química, vol. III. 2001.

COSTA, M. L. E.; GAMA, F. C.; BARROS, C. N.; SANTOS, J. O.; MACEDO, A. T.; COELHO, R. S.; PACHECO, M. G.; J. PARANHOS, B. A.. CeraTrap® como atrativo para a coleta massal de *Ceratitis capitata* (Diptera:Tephritidae). **Anais XXVI Congresso Brasileiro de Entomologia; IX Congresso Latino-americano de Entomologia**. Maceió-Alagoas. Brasil. 13 a 17, Março. 2016.

CRUZ-LÓPEZ, L; MALO, E; TOLEDO, J; VIRGEN, A; MAZO, A; ROJAS, J. A new potential attractant for *Anastrepha obliqua* from *Spondias mombin* fruits. **Journal of Chemical Ecology** 32 (2): 351-365. 2006.

CRUZ-LÓPEZ, L; MALO, E; TOLEDO, J; VIRGEN, A; MAZO, A; ROJAS, J. Behavioral and electrophysiological responses of the mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) to guava volatiles. **Florida Entomologist**, 2005.

DIAS, V.. Compatibilidade de acasalamento de populações do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) do Brasil. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal da Bahia. 2012.

DIAS, V. S.; SILVA, J.; LIMA, K. M.; PETITINGA, C. S. C. D.; HERNÁNDEZ-ORTIZ, V.; LAUMANN, R.; A. PARANHOS, BEATRIZ J.; URAMOTO, K.; ZUCCHI, R. A.; JOACHIM-BRAVO, I. S. An integrative multidisciplinary approach to understanding cryptic divergence in Brazilian species of the *Anastrepha fraterculus* complex (DIPTERA: TEPHRITIDAE). *Biological Journal of the Linnean Society*. 117: 725-746. 2016.

DMANDJA, J. M. D.. GCXGC-Comprehensive 2-D GC provides high-performance separations in terms of selectivity, sensitivity, speed, and structure. **Analytical Chemistry**, v. 167A, p.76, 2004.

EMPRESA BRASIL DE COMUNICAÇÃO – AGÊNCIA BRASIL. Produção de machos estéreis do *Aedes aegypti* deve começar em setembro. **Notícias-Geral**. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2016-02/producao-de-machos-estereis-do-aedes-aegypti-deve-comecar-em-setembro>>. Acesso em 30 out. 2017.

ENDLER, J. A.; HOUDE, A. E.. Geographic variation in female preference for male traits in *Poecilia reticulata*. **Evolution** 49: 456-468. 1995.

FERRARA, F.; VILELA, E.; JHAM, G.; EIRAS, A.; PICANÇO, M.; ATTYGALLE, A.; SVATOS, A.; FRIGHETTO, R.; MEINWALD, J.. Evaluation of the Synthetic Major Component of the Sex Pheromone of *Tuta absoluta* (Meyrick) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE). **Journal of Chemical Ecology**, Vol.27(5), 907-917. 2001.

FERVEUR, J.F.. The pheromonal role of cuticular hydrocarbons in *Drosophila melanogaster*. **Bioassays** 19: 353–358. 1997.

FLORES, S.; RIVERA, J. P.; HERNANDEZ, E.; MONTOYA, P.. The effect of ginger oil on the sexual performance of *Anastrepha* males (DIPTERA: TEPHRITIDAE). **Florida Entomologist**. 94(4):916-922. 2011.

FLORI, J. E.. Principais variedades de goiaba. **EMBRAPA – Informe Técnico**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/156958/1/Egidio-2016.pdf>>. Acesso em 02 set. 2017.

GALDINO, L. T.; RAGA, A.. Semioquímicos em Moscas-das-frutas. **Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios**. Documento técnico 29. 2016.

GARCIA, J. A. O.. Determination on Fruit Injury by Hot Water Treatment on Tommy Atkins Grown in Mexico. **INIFAP- Santiago Ixcuintla Experimental Station**. Disponível em <[http://www.mango.org/wp-content/uploads/2017/10/Determination\\_on\\_Fruit\\_Hydrothermal\\_Injury\\_Executive\\_Summary.pdf](http://www.mango.org/wp-content/uploads/2017/10/Determination_on_Fruit_Hydrothermal_Injury_Executive_Summary.pdf)>. Acesso em 25 out. 2017.

GODOY, M. J. S.; PACHECO, W. S. P.; MALAVASI, A. Moscas-das-frutas quarentenárias para o Brasil. *In*: SILVA, R. A.; LEMOS, W. de P.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas na Amazônia Brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais**. Macapá: Embrapa Amapá, 299p. 2011.

GONÇALVES, G. B.. Extração e identificação de constituintes voláteis das secreções de glândulas salivares de machos de *Ceratitis capitata* e *Anastrepha obliqua* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) e de carambola e manga. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Alagoas, 160 pp. 2005.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. The insects an outline of entomology. **Chapman & Hall**, 1996.

HALDER, A; GHOSH, A; GHOSH, S. Aggregation Pheromone Density Based Pattern Classification. **Fundamenta Informaticae** 92 345–362. 2009.

HEATH, R. R.; EPSKY, N. D.. Secretary of Agriculture. Washington DC. United States of America. **Attractants for frugivorous pest insects including vapor blends containing a 3-alkyl-1-butanol**. Intl. Pat. Class. A01N. WO 00/16617. 30 mar. 2000. The Patent Cooperation Treaty.

HEATH, R. R.; EPSKY, N. D.. Secretary of Agriculture. Washington DC. United States of America. **Trapping System for Fruit Flies**. Intl. Pat. Class. A01N 2502 / A01N 2510. US005939062A. 5,939,062. 17 ago.. 1990. The Patent Cooperation Treaty.

HENDRICH, J.; VERA, M T.; DE MEYER, M.; CLARKE, A. R.. Resolving cryptic species complexes of major tephritid pests, **ZooKeys** (540), pp. 5-39. 2015.

HERNÁNDEZ-ORTIZ, V; BARTOLUCCI, A.F.; MORALES-VALLES, P.; FRIAS, D.; SELIVON, D,. Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae): a multivariate approach for the recognition of South American morphotypes. **Annals of the Entomological Society of America**, 105, 305–318. 2012.

HERNÁNDEZ-ORTIZ, V.; CANAL, N. A.; SALAS, J. O. T. ; RUÍZ-HURTADO, F. M.; DZUL-CAUICH, J. F.. Taxonomy and phenotypic relationships of the *Anastrepha fraterculus* complex in the Mesoamerican and Pacific Neotropical dominions (Diptera, Tephritidae). **ZooKeys**, (540), pp. 95-124. 2015.

HOHENLOHE, P. A. & ARNOLD, S. J.. The dimensionality of mate choice, sexual isolation, and speciation. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 107(38): 16583-16588. 2010.

HOWSE, P. E.. University of Southampton, Southampton – United Kingdom. **Insect attractant**. Intl. A01N 25/00 PN 4,820,513. 11 abr. 1989.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Indicadores IBGE | Estatística da Produção Agrícola. Dezembro de 2016**. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_\[mensal\]/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/2016/estProdAgr\\_201612.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo_Indicadores_IBGE/2016/estProdAgr_201612.pdf)> . Acesso em 12 ago. 2017.

INDERJIT & DAKSHINI, K. M. M. On Laboratory Bioassays in Alelopathy. **Bot. Rev.** 61, 28. 1995.

JANSSON-CHARRIER, M.; GUIBAL, E.; ROUSSY, J.; DELANGHE, B.; LE CLOIREC, P.. Vanadium (IV) sorption by chitosan: kinetics and equilibrium. **Water Research** 30: 465–475. 1996.

KAINOH, Y.. Wind Tunnel: a Tool to Test the Flight Response of Insects to Semiochemicals, Wind Tunnels and Experimental Fluid Dynamics Research Jorge Colman Lerner. **IntechOpen**, DOI: 10.5772/18166. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/wind-tunnels-and-experimental-fluid-dynamics-research/wind-tunnel-a-tool-to-test-the-flight-response-of-insects-to-semiochemicals>>. Acesso em 13 nov. 2017.

KENDRA, P. E.; MONTGOMERY, W. S.; MATEE, D.M.; PUCHE, H.; EPSKY, N. D. e HEATH, R.R. Effect of age on EAG response and attraction of female *Anastrepha suspensa* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) to ammonia and carbon dioxide. **Environ. Entomol.** 34 (3): 584-590. 2005.

KNOLHOFF, L. M.; HECKEL, D. G.. Behavioral Assays for Studies of Host Plant Choice and Adaptation in Herbivorous Insects. **Annual Review of Entomology**. Vol.59:263-278. 2014.

LANDOLT, P.J.; PHILIPS, T.W. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects, 1997.

LIMA, I.S.; HOUSE, P, E; DO NASCIMENTO, R.R. Volatile substances from male *Anastrepha fraterculus* Wied. (DIPTERA: TEPHRITIDAE): Identification and behavioural activity. **J Braz Chem Soc** 12: 196-201. 2001.

LIMA, I. S; HOWSE, P.E. Diurnal Activity and Sexual Maturation of the South American Fruit fly (DIPTERA: THEPHRITIDAE) IN THE Laboratory. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**. 26: 299-308, 1997.

LIMA-MENDONÇA, A.; MENDONÇA, A. L.; SANT'ANA, A.E.G; DO NASCIMENTO, R.R. Semiochemicals of fruit flies of the genus *Anastrepha*. **Quim Nova** 37:293–301. 2014.

LOFSTEDT, C.; HERREBOUT, W.M.; MENKEN, S. B. J.. Sex pheromones and their potential role in the evolution of reproductive isolation in small ermine moths (Yponomeutidae). **Chemoecology** 2: 20–28. 1991.

MACHOTA JUNIOR, R.; BORTOLI, L. C.; LOECK, A. E.; GARCIA, F. R. M.; BOTTON, M.. Estratégia Atrativa. **Cultivar. Hortaliças e Frutas**. Ano XI, Nº 81: 20-23. 2013.

MAFRA-NETO, A.; CARDÉ, R. T. Rate of realized interception of pheromone pulses in different wind speeds modulates almond moth orientation. **Journal of Comparative Physiology** . Vol.182(5), 563-572, 1998.

MALAVASI, A.. Biologia, ciclo de vida, relação com o hospedeiro, espécies importantes e biogeografia de tefritídeos In: MALAVASI, A.; VIRGINIO, J. (Org.). Biologia, monitoramento e controle: **V Curso Internacional de Capacitação em Moscas-das-Frutas**. Juazeiro, Bahia, 2009.

MALAVASI, A.; MORGANTE, J. S.; ZUCCHI, R. A. Biologia de moscas-das-frutas (DIPTERA: TEPHRITIDAE) lista de hospedeiros e distribuição geográfica. **Rev. Bras. Biol**, 1980.

MALO, E. A; GALLEGOS-TORRES, I. JORGE TOLEDO, JAVIER VALLE-MORA & ROJAS, J. C.. Attraction of the West Indian fruit fly to mango fruit volatiles. **Entomologia Experimentalis et applicata**.142: 45–52, 2012.

MEDEIROS-SANTANA, L. & ZUCOLOTO, F. S.. Sexual receptivity of *Anastrepha obliqua* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) wild females affected by nutrition and egg load. **Entomological Science**. Vol (19) 233-238). 2016.

MILET-PINHEIRO, P.; NAVARRO, D. M. A.; AQUINO, N. C.; FERREIRA, L. L.; TAVARES, R. F.; SILVA, R. C. C.; LIMA-MENDONÇA, A.; VANÍČKOVÁ, L.; MENDONÇA, A. L.; NASCIMENTO, R. R.. Identification of male-borne attractants in *Anastrepha fraterculus* (DIPTERA: TEPHRITIDAE). **Chemoecology**. Vol.25(3), pp.115-122. 2015.

MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS – MDIC. **Balança Comercial – Janeiro a Dezembro 2016**. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/index.php/comercio-externo/estatisticas-de-comercio-externo/balanca-comercial-brasileira-acumulado-do-ano?layout=edit&id=3056>>. Acesso em 11 ago. 2017.

MONTES, S. M. N. M.; RAGA, A.; SOUZA-FILHO, M. F.. Moscas-das-frutas (DIPTERA: TEPHRITIDAE) na região de Presidente Prudente, São Paulo. **Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios**. Documento técnico 16. 2013.

NANDAGOPAL, V.; PRAKASH, A.; SASMAL, A.; SASMA; S; NAYAK, P. L.. Use of biopolymers for controlled release of pheromones. **Pheromone Resources**. 2015.

NASCIMENTO, A. S. & CARVALHO, R. S. Manejo Integrado de moscas-das-frutas. In: Malavasi, A.; Zucchi, R. A. (org.) **Moscas das frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2000.

NATION J, L. BIOLOGY OF PHEROMONE RELEASE BY MALE CARIBBEAN FRUIT FLIES, *Anastrepha suspensa* (DIPTERA: TEPHRITIDAE). Plenum Publishing. **Journal of Chemical Ecology**, Vol. 16(2), 1990.

NAVARRO-LLOPIS, V.; ALFARO, C.; PRIMO, J.; VACAS, S.. Response of two tephritid species, *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata*, to different emission levels of pheromone and parapheromone. **Crop Protection** 30: 913-918. 2011.

NIOGRET, J; MONTGOMERY, W. S; KENDRA, P. E.; HEAT, R.R. EPSKY, N.D. Attraction and Electroantennogram Responses of Male Mediterranean Fruit Fly to Volatile Chemicals from Persea, Litchi and Ficus Wood. **Journal of Chemical Ecology**. Vol. 37: 483–491. 2011.

NONDILLO, A.; REDAELLI, L. R.; PINENT, S. M. J.; BOTTON, M.. Injury characterization of *Frankliniella occidentalis* in strawberry/Caracterizacão das injurias causadas por *Frankliniella occidentalis* no morangueiro. **Ciência Rural**, Vol.40(4), p.820(7). 2010.

NORRBOM, A. L.; KORYTKOWSKI C. A.. New species of *Anastrepha* (DIPTERA: TEPHRITIDAE), with a key for the species of the megacanthaclade. **Zootaxa** 3478: 510–552. 2012.

OLIVEIRA, R. B.. Sensilas antenais de *Anastrepha fraterculus* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) e respostas a voláteis de frutíferas, substâncias sintéticas e a produtos fitossanitários utilizados na produção orgânica. **Tese de Doutorado**. Porto Alegre: R. B. de Oliveira, 2010.

PARANHOS, B. J.. **Biofábrica Moscamed Brasil - Tecnologia ambientalmente segura no combate às pragas**. II Simpósio de Manga do Vale do São Francisco - 2007. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPATSA/36032/1/OPB1359.pdf>>. Acesso em: 06 out. 2017.

PARANHOS, B. J.. **Moscas-das-frutas que oferecem riscos à fruticultura brasileira**. Embrapa Semiárido. 2008. Disponível em <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/158610/1/OPB2070.pdf>>. Acesso em: 06 mar. 2017.

PARANHOS, B. J.; BARBOSA, F. R.; HAJI, F. N. P.; ALENCAR, J. A.; MOREIRA, A. N.. **Monitoramento de moscas-das-frutas e o seu manejo na fruticultura irrigada do Submédio São Francisco**. 2004. Disponível em <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/157819/1/OPB702.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2016.

PEDROSO, M. P.; DE GODOY, L. A. F.; FIDÉLIS, C.H. V.; FERREIRA, E. C.; POPPI, R. J.; AUGUSTO, F.. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC x GC). **Química Nova**, v. 32, (2), p. 421-430, 2009.

POTAMITIS, I.; RIGAKIS, I.; TATLAS, NICOLAOS-ALEXANDROS . Automated Surveillance of Fruit Flies. **Sensors (Basel)** V.17(1); 2017

RAGA, A.; SOUZA-FILHO, M. F.. **Manejo e Monitoramento de Moscas-das-frutas**. Disponível em <<http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/IIIIRifib/43-49.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

RAMASUBBU, R.; DIVYA, C. & ANJANA, S.. A note on the taxonomy, field status and threats to three endemic species of *Syzygium* (Myrtaceae) from the southern Western Ghats, India. **Journal of Threatened Taxa** 8(11): 9384–9390. 2016.

RANGEL, L. E. P.. Mapa repassará R\$ 24 milhões a 15 estados para fortalecer defesa agropecuária. 2016. **Notícias**. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/noticias/mapa-repassara-r-24-milhoes-a-15-estados-para-fortalecer-defesa-agropecuaria>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

REDDY, K.; SHARMA, K.; SINGH, S.. Attractancy potencial of culturable bacteria from the gut of peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saunders). **Phytoparasitica**, Bet Daga, v. 42(5). 2014.

RIVERA, E. M. A.; ARREOLA, J. T.. LEON, J. C. R.; CRUZ-LOPEZ, L. C.. **Atrativo para a mosca de fruta *Anastrepha obliqua***. Intl. Cl. A01N 37/02. PI0610227-1 A2, WO 2006/121317. 08 jun. 2010. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Revista Brasileira de Propriedade Industrial.

ROBACKER, D. C.. Behavioral responses of female Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens*, to components of male-produced sex pheromone. **Journal of Chemical Ecology**. Vol :14(9) 1715 -1726. 1988.

RODRIGES, M. D. A.; RAGA, A. MALDONADO, JR.. Comparison of food attractants for monitoring fruit fly (DIPTERA: TEPHRITIDAE) in citrus orchards in Brazil. **Acta Horticulturae**. Vol. 1065. p. 1033-1040. 2015.

ROELOFS, W.L.; ROONEY, A. P.. Molecular genetics and evolution of pheromone biosynthesis in Lepidoptera. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 100 (Suppl.): 14599. 2003.

ROUAULT, J.D.; MARICAN, C.; WICKER-THOMAS, C.; JALLON, J. M.. Relations between cuticular hydrocarbons (HC) polymorphism, resistance against desiccation and breeding temperature, a model for HC evolution in *D. melanogaster* and *D simulans*. **Genetica** 120: 195-212. 2004.

RUNDLE, H.D.; NOSIL, P.. Ecological speciation. **Ecol. Lett.** 8: 336-352. 2005

RYAN, M. J.; RAND, A. S.. Species recognition and sexual selection as a unitary problem in animal communication. **Evolution** 47: 647-657. 1993.

SALLES, L. A. Biologia e ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus* In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A.. **Moscas das frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2000.

SANTOS, J. C. G. S.. Estudo da preferência alimentar de machos de *Anastrepha* spp. e dos constituintes voláteis liberados por estes machos e por seu hospedeiro principal, *Psidium guajava* L. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Alagoas, 2003.

SARLES, L. A.; VERHAEGHE, A; FRANCIS, F.; VERHEGGEN, F. J.. Semiochemicals of *Rhagoletis* fruit flies: Potential for integrated pest management. **Crop Protection**. 78: 114 e118. 2015.

SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P.; MORGANTE, J. S.. A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (DIPTERA, TEPHRITIDAE). **Annals of the Entomological Society of America**, Vol. 98(3), p. 367-381, 2005.

SELIVON, D.; PERONDINI, A. L.P.; MORGANTE, J. S.. Haldane´s rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (DIPTERA: TEPHRITIDAE). **Genetics and Molecular Biology** 22(4): 507-510. 1999.

SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P.; MORGANTE, J. S. New variant forms in the *Anastrepha fraterculus* complex. In Proc. 6th International Fruit Flies Symposium, B. Barnes (org.), **Isteg Scientific Publications**, Irene, South Africa, 2004.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE). **Boletim de Inteligência - Outubro | 2015**. Agronegócio – Fruticultura. Disponível em: <[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS\\_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/\\$File/5791.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/$File/5791.pdf)>. Acesso em: 12 ago. 2017.

SILVA, A. B.; BATISTA, J. L.. Mosca-das-frutas: uma ameaça à fruticultura. 2015. **Artigos**. Disponível em: < <http://www.grupocultivar.com.br/artigos/mosca-das-frutas-uma-ameaca-a-fruticultura>>. Acesso em: 02 out. 2017.

SILVA, C. E.. Estudo Comparativo do Feromônio de Agregação de *Ceratitidis capitata* e *Anastrepha obliqua* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) e dos Odores de seus Frutos Hospedeiros Preferencial e Secundário, *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae) e *Carica papaya* L. (Caricaceae). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Alagoas, 76 pp. 2005.

SILVA, H. S. R. C., SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E.. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**. Vol. 29,(4) ; 776-785, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.. Pheromones: background and potential for use in insect pest control. **Science**. Vol 213. 4514: 1326 -1332. 1981.

SMADJA, C.; GANEM, G.. Subspecies recognition in the house mouse: A study of two populations from the border of a hybrid zone. **Behavioral Ecology**. 13 (3):312-320. 2002.

SUREAU, G.; FERVEUR, J. F.. Co-adaptation of pheromone production and behavioural responses in *Drosophila melanogaster* males. **Genetics Resources**. 74: 129–137. 1999.

STIPANOVIC, A. J.; HENNESSY, P. J.; WEBSTER, F. X.; TAKAHASHI, Y.; Microparticle Dispensers for the Controlled Release of Insect Pheromones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 52, No. 8, 2004.

TEAL, E. A.; WALSE, S. S.. Secretary of Agriculture. United States of America. **Compositions and Methods for Attracting *Anastrepha* Species**. Intl. Cl. A01N 25/00 A01N 43/04. PN US8,128,948B1. 6 mar. 2012.

THOLL, D.; BOLAND, W.; HANSEL, A.; LORETO, F.; ROSE, U.S.R.; SCHNITZLER, JORG-PETER. Practical approaches to plant volatile analysis. **The Plant Journal**. 45, 540–560. 2006.

THOMAZINI, M. J.. A Comunicação Química entre os Insetos: Obtenção e Utilização de Feromônios no Manejo de Pragas. **Embrapa Florestas**- Capítulo em livro técnico-científico (ALICE). 2012.

VANIČKOVÁ, L; BŘÍZOVÁ, R.; MENDONÇA, A. L.; POMPEIANO, A.; DO NASCIMENTO, R.R.. Intraspecific variation of cuticular hydrocarbon profiles in the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) species complex. **Journal of Applied Entomology**. Vol.139(9): 679-689. 2015.

VANIČKOVÁ, L; DO NASCIMENTO, R.R.; HOSKOVEC. M.; JEŽKOVÁ, Z.; BŘÍZOVÁ, R.; TOMČALA, A.; KALINOVÁ, B.. Are the wild and laboratory insect populations different in semiochemical emission? The case of medfly sex pheromone. **J. Agr. Food Chem**. 60: 7168–7176. 2012.

VANICKOVÁ, L.. Chemical ecology of fruit flies: genera *Ceratitis* and *Anastrepha* **Ph.D. thesis**, Institute of Chemical Technology, Praga, Republica Tcheca. 2012.

VERA, M. T.; RUIZ, M. J.; OVIEDO, A.; ABRAHAM, S.; MENDOZA, M.; SEGURA, D. F.; KOULOSSIS, N. A.; WILLINK, E.. Fruit compounds affect male sexual success in the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (DIPTERA: TEPHRITIDAE). **Journal of Applied Entomology**. 137(Suppl. 1) 2–10. 2013.

VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C.. Introdução aos Semioquímicos e Terminologia. In: VILELA, E. F. e DELLA LUCIA, T. M. C. eds. **Feromônios de Insetos: Biologia, Química e Emprego no Manejo de Pragas**, 2ª edição, Ribeirão Preto: Holos, p.9-12. 2001.

VOSSHALL, L. B.. Scent of a fly. **Neuron** 59(5):685-689. 2008

WEE, SUK-L; TAN, KENG-H.. Male endogenous pheromonal component of *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae) deterred gecko predation. **Chemoecology**. Vol. 15(4): 199-203. 2005.

ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA J. T. B.; LEAL, W. S.. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos **Química Nova**. Vol: 22(2):263 -268. 1999.

ZARBIN, PAULO H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R.. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil **Química Nova**. Vol: 32(3):722-731. 2009.

ZARBIN, P. H. G.. Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos. In: Vilela E. F., Della-Lucia, M. C. (Org.). **Feromônios de Insetos: Biologia, Química e Emprego no Manejo de Pragas**. 2<sup>a</sup> ed. Holos, Ribeirão Preto, Brasil, p. 45–5, 2001.

ZUCCHI R. A.. Diversidad, distribución y hospederos del género *Anastrepha* en Brazil. In: Hernández-Ortiz, V. (org.). **Moscas de la fruta em Latinoamérica (Diptera): Diversidad, biología y manejo**. México, S&G, p. 77-100. 2007.

ZUCCHI, R. A.. Taxonomia. In: Malavasi, A.; Zucchi, R. A. (org.) **Moscas das frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2000.

ZUCCHI, R. A.. Espécies de *Anastrepha*, Sinonímias, Plantas Hospedeiras e Parasitóides In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas das frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2000b.

(<[http://www.lea.esalq.usp.br/Anastrepha/edita\\_ssp\\_i.php](http://www.lea.esalq.usp.br/Anastrepha/edita_ssp_i.php)>. Acesso em 19 de março de 2017).

(<<http://www.pherobase.com/database/compbygen/genus-comp-anastrepha.php>>. Acesso em: 19 mar. 2017).

## 10 APÊNDICES

### 10.1 APÊNDICE – A: Fichas descritivas dos compostos sintéticos adquiridos e utilizados na obtenção de extratos e formulação de soluções para isolamento e identificação de voláteis e para a realização de bioensaios.

486728 ALDRICH  
**Hexane-1-<sup>13</sup>C**  
 99 atom % <sup>13</sup>C

SDS SIMILAR PRODUCTS

CAS Number 27581-27-7 | Linear Formula CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub><sup>13</sup>CH<sub>3</sub> | Molecular Weight 87.17 | MDL number MFCD00001400  
 PubChem Substance ID 24872198

Compra Documentação & Segurança Artigos Revisados por Colegas

#### Propriedades

Related Categories	Alphabetical Listings, G-H, Stable Isotopes Mais...
InChI Key	VLKZOEYAKHREP-OUBTZVSYSA-N
isotopic purity	99 atom % <sup>13</sup> C
assay	99% (CP)
refractive index	n <sub>20</sub> /D 1.375(lit.)
bp	69 °C(lit.)
mp	-95 °C(lit.)
density	0.667 g/mL at 25 °C
mass shift	M+1

Show Fewer Properties ^

73941 SIGMA-ALDRICH  
**(-)-trans-Caryophyllene**  
 analytical standard  
 Synonym: β-Caryophyllene, trans-(1R,9S)-8-Methylene-4,11,11-trimethylbicyclo[7.2.0]

SDS SIMILAR PRODUCTS

CAS Number 87-44-5 | Empirical Formula (Hill Notation) C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> | Molecular Weight 204.36  
 Beilstein Registry Number 2044564 | EC Number 201-746-1 | MDL number MFCD00001400  
 PubChem Substance ID 329766500

Compra Documentação & Segurança Artigos e Protocolos

#### Propriedades

Related Categories	A - D, A-F, A-L, Additional Standards, All Alphabetically Sorted, Mais...
grade	analytical standard
InChI Key	NPNUFJAVOONJE-GFUGXAQUSA-N
assay	≥98.5% (sum of enantiomers, GC)
form	neat
optical activity	[α] <sub>20</sub> /D -10±1°, neat
shelf life	limited shelf life, expiry date on the label
application(s)	HPLC: suitable gas chromatography (GC): suitable
bp	262-264 °C(lit.)
density	0.902 g/mL at 20 °C(lit.)

218367 ALDRICH  
**(S)-(-)-Limonene**  
 96%

SDS SIMILAR PRODUCTS

CAS Number 5989-54-8 | Empirical Formula (Hill Notation) C<sub>10</sub>H<sub>16</sub> | Molecular Weight 136.24  
 Beilstein Registry Number 2323991 | EC Number 227-815-6 | MDL number MFCD00001400  
 PubChem Substance ID 24853063

POPULAR DOCUMENTS: SPECIFICATION SHEET (PDF) | FTNMR (PDF)

Compra Documentação & Segurança Artigos e Protocolos 1

#### Propriedades

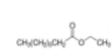
Related Categories	Alkenes, Asymmetric Synthesis, Cell Biology, Chemical Synthesis, Chiral Building Blocks, Mais...
vapor density	4.7 (vs air)
vapor pressure	<3 mmHg ( 14.4 °C)
InChI Key	XMGQYMWVWDXHJM-SNVBAGLSA-N
assay	96%
optical activity	[α] <sub>19</sub> /D -94°, c = 10 in ethanol
expl. lim.	6.1 %
refractive index	n <sub>20</sub> /D 1.471(lit.)
bp	175-177 °C(lit.)
density	0.844 g/mL at 25 °C(lit.)

**SIGMA-ALDRICH**  
 3050 Spruce Street  
 W  
 Ema  
 Outs

#### Product Specification

Product Name: Ethyl octanoate - ≥98%, FCC, FG

Product Number: W244902  
 CAS Number: 106-32-1  
 MDL: MFCD00009552  
 Formula: C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>  
 Formula Weight: 172.26 g/mol



TEST	Specification
Appearance (Color)	Colorless
Appearance (Form)	Liquid
Refractive Index at 20 °C	1.416 - 1.420
Infrared spectrum	Conforms to Structure
Purity (GC)	≥ 98.0 %
Specific Gravity	0.863 - 0.867
At 25°C	
Solubility (Turbidity)	Clear
Solubility (Color)	Colorless
1ml/4ml 70% Ethanol	
Acid Value	≤ 1.0 ml
Arsenic (As)	≤ 3 ppm
Cadmium (Cd)	≤ 1 ppm
Mercury (Hg)	≤ 1 ppm
Lead (Pb)	≤ 10 ppm
Expiration Date Period	5 Years

Specification: PRD.1.ZQ5.10000005053

183164 SIGMA  
**(R)-(+)-Limonene**  
97%  
Synonym: (+)-p-Mentha-1,8-diene, (+)-Carvene, (R)-4-Isopropenyl-1-methyl-1-cyclohexene

[SDS](#) [SIMILAR PRODUCTS](#)

CAS Number 5989-27-5 Empirical Formula (Hill Notation) C<sub>10</sub>H<sub>16</sub> Molecular Weight 136.2  
Beilstein Registry Number 2204754 EC Number 227-813-5 MDL number MFCD00062991  
PubChem Substance ID 57647732

[POPULAR DOCUMENTS: SPECIFICATION SHEET \(PDF\)](#)

**Compra** Documentação & Segurança Artigos e Protocolos **9**

### Propriedades

Related Categories	Alkenes, Armoracia rusticana (Horseradish), Artemisia vulgaris, Aspalathus linearis (Rooibos tea), Asymmetric Synthesis, Mais...
vapor density	4.7 (vs air)
vapor pressure	<3 mmHg ( 14.4 °C)
InChI Key	<b>XMGQYMWDXHJM-JTQLQIEISA-N</b>
assay	97%
optical purity	ee: 98% (GLC)
expl. lim.	6.1 %
refractive index	n <sub>20</sub> <sup>D</sup> 1.473(lit.)

[Show More \(11\)](#)

## 10.2 APÊNDICE – B: Artigo publicado no *Florida Entomologist* – Dez/2013

Gonçalves et al.: Pheromone Communication in *Anastrepha obliqua* 1365

### PHEROMONE COMMUNICATION IN *ANASTREPHA OBLIQUA* (DIPTERA: TEPHRITIDAE): A COMPARISON OF THE VOLATILES AND SALIVARY GLAND EXTRACTS OF TWO WILD POPULATIONS

GLÁUCIA B. GONÇALVES<sup>1,2</sup>, CARLOS E. SILVA<sup>1</sup>, ADRIANA DE LIMA MENDONÇA<sup>1</sup>, LUCIE VANÍČKOVÁ<sup>1,3</sup>,  
ALEŠ TOMČALA<sup>2</sup> AND RUTH R. DO NASCIMENTO<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, Laboratório de Ecologia Química,  
Campus A. C. Simões, Tabuleiro dos Martins 57072-970, Maceió, AL, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Federal de Sergipe, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Engenharia Química,  
Campus José Aluisio de Campos, São Cristóvão, 49100-000, Aracaju, SE, Brazil

<sup>3</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the ASCR, v. v. i., Flemingovo nám.2, CZ 166 10,  
Prague 6, Czech Republic

\*Corresponding author: E-mail: ruth.nascimento@pq.cnpq.br

#### ABSTRACT

The West Indian fruit fly *Anastrepha obliqua* Macquart (Diptera: Tephritidae) is one of the major pests on mango (*Mangifera indica* L.; Sapindales: Anacardiaceae) and starfruit (*Averrhoa carambola* L.; Oxalidales: Oxalidaceae) crop plantations in Brazil. Pheromone communication inter alia plays an important role in fruit-fly courtship behavior. In order to highlight the site of pheromone synthesis, we identified and compared the volatiles from the aeration extracts of calling males with the volatiles produced by their salivary glands in 2 wild populations of *A. obliqua* collected from mangoes and starfruits. In addition, we performed a series of bioassays to compare the biological significance of both extracts. In total, 36 volatile compounds were identified, with 8 of them being shared by the 2 populations and the 2 extract types. Linalool and  $\alpha$ -copaene were exclusively found in the aeration extract while ethyl heptanoate, methyl octanoate, and 1-nonanol were detected only in the salivary-gland extracts. The chemical profiles of the volatiles from the aeration extracts and from the salivary-gland extracts differed significantly between the 2 populations as well as the chemical profiles of both extracts within each population. The quantities of the 8 shared compounds generated a variability of more than 60% in the mango population and 80% in the starfruit population. The similarities observed between the chemical profiles of the aeration extracts and the salivary-gland extracts suggest that the latter could be the storage site and probably also the production site of some pheromone components in this fruit-fly species. This hypothesis is supported by the comparable biological activities of both extracts in terms of their attractiveness for conspecific females.

**Key Words:** salivary glands, volatile compounds, sex attractant, wild population, gas chromatography – mass spectrometry

#### RESUMO

A mosca das frutas do oeste indiano Macquart (Diptera: Tephritidae) é uma das maiores pragas da cultura de manga (*Mangifera indica* L.; Sapindales: Anacardiaceae) e carambola (*Averrhoa carambola* L.; Oxalidales: Oxalidaceae) no Brasil. A comunicação através de feromônios, entre outras coisas, possui uma importante função no comportamento de corte em moscas das frutas. A fim de elucidar o local de síntese de feromônios, identificamos e comparamos os voláteis obtidos através de extratos de aeração de machos em chamamento com os voláteis produzidos por suas glândulas salivares em duas populações selvagens de *A. obliqua*, coletadas a partir de mangas e carambolas. Além disso, realizamos uma série de bioensaios para comparar a significância biológica de ambos os extratos. No total, 36 compostos voláteis foram identificados, com 8 deles sendo comuns para as duas populações e os dois tipos de extratos. Linalol e  $\alpha$ -copaeno foram exclusivamente encontrados nos extratos de aeração enquanto o heptanoato de etila, octanoato de metila e 1-nonanol foram detectados somente nos extratos de glândulas salivares. O perfil químico dos voláteis obtidos por aeração e a partir dos extratos de glândulas salivares diferiram significativamente

## 10.3 APÊNDICE – C: Artigo publicado no *Florida Entomologist* – Set/2013

Brizová et al.: Pheromone Analyses of *Anastrepha fraterculus* Complex 1107

### PHEROMONE ANALYSES OF THE *ANASTREPHA FRATERCULUS* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) CRYPTIC SPECIES COMPLEX

RADKA BRIZOVÁ<sup>1,2</sup>, ADRIANA L. MENDONÇA<sup>3</sup>, LUCIE VANÍČKOVÁ<sup>2\*</sup>, ALANA L. MENDONÇA<sup>2</sup>, CARLOS EDUARDO DA SILVA<sup>2</sup>,  
ALES TOMČALA<sup>4</sup>, BEATRIZ AGUIAR JORDÃO PARANHOS<sup>5</sup>, VANESSA SIMÕES DIAS<sup>6</sup>, IARA SORRI JOACHIM-BRAVO<sup>7</sup>,  
MICHAL HOSKOVEC<sup>1</sup>, BLANKA KALINOVÁ<sup>1</sup> AND RUTH R. DO NASCIMENTO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, Flemingovo nám. 2, CZ-166 10 Prague 6, Czech Republic

<sup>2</sup>Institute of Chemical Technology in Prague, Technická 5, CZ-166 28 Prague 6, Czech Republic

<sup>3</sup>Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Avenida Lourival de Melo Mota, s/n,  
Tabuleiro, 57072-970, Maceió, AL, Brazil

<sup>4</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-Semiárido), BR 428, Zona Rural, 56302-970,  
Petrolina, PE, Brazil

<sup>5</sup>Universidade Federal da Bahia, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Geral, R. Barão do Geremoabo  
s/n, Campus Universitário de Ondina, 40170-290, Salvador, BA, Brazil

\*Corresponding author; E-mail: lucie.vanicikova@gmail.com

Supplementary material for this article in *Florida Entomologist* 96(3) (2013) is online  
at <http://purl.fcla.edu/fcla/entomologist/browse>

#### ABSTRACT

The South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex is presently one of the most studied pest models in terms of speciation and population mating compatibility. The improvement of pest-control techniques has strongly relied on successful implementation of laboratory strains into wild populations. Pheromone communication plays an important role in the mating process in the South American fruit fly. Therefore, the main goal of the present study was to investigate the pheromone composition of 7 different populations, originating from geographically distant locations in Brazil and Argentina. Fourteen volatile compounds were identified in calling male emanations by GC×GC/TOF-MS and the data obtained were subsequently analyzed by multivariate statistics. The pheromone composition varied both quantitatively and qualitatively among the studied populations. These results will serve as the basis for further electrophysiological analyses.

**Key Words:** South American fruit fly, two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection (GC×GC/TOF-MS), principal component analysis (PCA)

#### RESUMO

O complexo de espécies crípticas *Anastrepha fraterculus* é, hoje em dia, um dos modelos de insetos-praga mais estudados no que se refere a especiação e compatibilidade populacional. O aperfeiçoamento das técnicas empregadas no controle de insetos-praga é fundamentada no sucesso na introdução de populações de laboratório entre as populações selvagens, em condições de campo. A comunicação mediada por feromônios, desempenha uma importante função no processo de acasalamento da mosca-das-frutas Sul Americana. Desta modo, o principal objetivo do presente estudo foi investigar a composição do feromônio de 7 populações diferentes de *A. fraterculus*, oriundas de regiões brasileiras geograficamente distintas e da Argentina. 14 compostos, provenientes de misturas liberadas por machos em chamamento, foram identificados por cromatografia gasosa bidimensional acoplada a detector time-of-flight e espectrometria de massas e os dados obtidos foram subsequentemente submetidos a análises estatísticas multivariadas. A composição do feromônio variou qualitativamente e

## 10.4 APÊNDICE – D: Depósito de Pedido de Patente sobre formulação de compostos

BRASIL Acesso à informação Participe Serviços Legislação Canais

Instituto Nacional da Propriedade Industrial  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

Consulta à Base de Dados do INPI [ Início | Ajuda? ]

» Consultar por: Base Patentes | Finalizar Sessão 1/1

### Depósito de pedido nacional de Patente

(21) Nº do Pedido: **BR 10 2016 003821 9 A2**

(22) Data do Depósito: 23/02/2016

(43) Data da Publicação: 29/08/2017

(47) Data da Concessão: -

(51) Classificação IPC: A01N 65/28 ; A01P 19/00

(54) Título: FORMULAÇÕES SINTÉTICAS COM ATIVIDADE DE CAIROMÔNIO A PARTIR DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EMITIDOS POR FRUTOS DE PSIDIUM GUAJAVA (GOIABA), EFICAZES NO CONTROLE DA MOSCA-DAS-FRUTAS SUL AMERICANA *ANASTREPHA FRATERCULUS*

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a formulações com atividade de cairomônio a partir de formulações sintéticas provenientes de compostos voláteis emitidos por frutos de *Psidium guajava* (goiaba), eficazes no controle da mosca-das-frutas Sul Americana *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). Em uma primeira concretização, a composição da referida formulação compreende: a-copaeno, a-trans-cariofileno, octanoato de etila, (R)-(+)-limoneno e (S)-(-)-limoneno e, (b) um veículo agricolamente aceitável. A razão entre tais componentes nas composições da invenção é de 1:1:1:1:1. A presente invenção também se refere ao método de controle desta praga através da utilização da formulação obtida a partir desta invenção. Tal aplicação abrange o setor de fruticultura podendo atuar em diferentes regiões onde a cultura desse fruto está sendo disseminada.

(71) Nome do Depositante: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS (BR/AL)

(72) Nome do Inventor: RUTH RUFINO DO NASCIMENTO / LUCIE VANÍČKOVÁ / RAPHAEL DE FARIAS TAVARES / [Adriana de Lima Mendonca](#) / [CARLOS EDUARDO DA SILVA](#) / FABIANE CAXICO DE ABREU GALDINO / LUANA LIMA FERREIRA / NATHALY COSTA DE AQUINO / JÉSSICA DE LIMA SANTOS