



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

JANEILDA COSTA VAZ

Uso da ecologia química para o controle do *Alphitobius diaperinus* na Avicultura.

Maceió

2018

JANEILDA COSTA VAZ

Uso da ecologia química para o controle do *Alphitobius diaperinus* na Avicultura.

Defesa de Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da RENORBIO da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana

Co-orientador: Prof.Dr. Henrique Fonseca Goulart

Maceió

2018

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

Bibliotecária Responsável: Janis Christine Angelina Cavalcante – CRB: 1664

V393u Vaz, Janeida Costa.
Uso da ecologia química para o controle do *Alphitobius Diaperinus* na avicultura / Janeilda Costa Vaz. – 2018.
136f. : il. color., graf., tabs.

Orientador: Antônio Euzébio Goulart Santana.
Tese (Doutorado em Biotecnologia - RENORBIO) – Universidade Federal de Alagoas. Rede Nordeste de Biotecnologia. Maceió, 2018.

Inclui bibliografia.
Inclui apêndices.

1. Coleopteros. 2. Cairomônios. 3. Insetos – Controle de pragas. I. Título.

CDU: 577.1:639.3

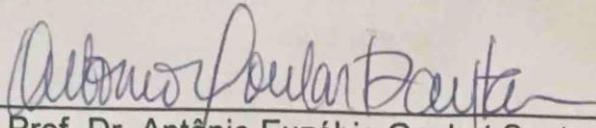
JANEÍLDA COSTA VAZ

Uso da ecologia química para o controle de *Alphitobius diaperinus* na avicultura

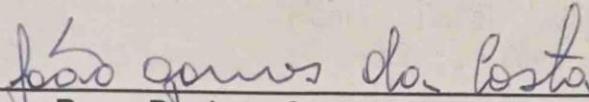
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Aprovada em: 09/02/2018.

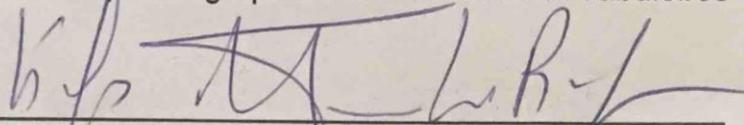
BANCA EXAMINADORA



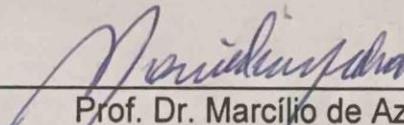
Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



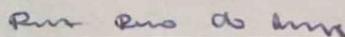
Pesq. Dr. João Gomes da Costa
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Tabuleiros Costeiros



Dr. Karlos Antônio Lisboa Ribeiro Júnior
Pesquisador CNPq/FAPEAL/UFAL



Prof. Dr. Marcílio de Azevedo
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE



Prof.ª Dr.ª Ruth Rufino do Nascimento
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Aos meus filhos Ítalo, Igor e Ulisses, meu esposo Ulisses, e aos meus pais, Leni e José Braz (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a realização de mais uma conquista, me dando forças, sabedoria e sustento para as horas boas e, principalmente, para as mais difíceis.

À minha família pelo apoio e pela paciência, em especial, minha mãe Leni e meu esposo Ulisses.

Ao Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana, por me orientar, sempre disponível e disposto a ensinar.

A Dra. Cenira Monteiro pelo apoio durante as aerações e a Dra. Jaqueline Maria Santos pelo apoio sempre que precisei.

Ao Dr. Chrystian Iezid Maia e ao Dr. João Gomes, pelo apoio nas análises estatísticas.

A todos demais integrantes do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais – LPqRN, bolsistas de iniciação científica, alunos de pós-graduação, pós-doutorandos e demais pesquisadores, por terem me acolhido e me ensinado muitas coisas, em especial, a Ana Paula, Nádia e Merybeth Triana, por sempre estarem dispostas a ajudar.

Aos técnicos de laboratório, especialmente Aldy dos Santos, pelo apoio durante a fase experimental.

Aos meus colegas docentes do Instituto Federal de Pernambuco - IFPE, por se disponibilizarem a assumir minhas funções durante meu afastamento.

Ao Dr. Alessandro Riffel, pesquisador da EMBRAPA pelo apoio.

Ao proprietário e funcionários da Fazenda por me acolherem durante todo trabalho a campo, nos aviários e no fornecimento dos insetos.

A todos os demais que de alguma forma estão me apoiando durante esse curso, seja de forma direta ou indireta, pois certamente sem vocês a caminhada seria mais difícil.

RESUMO

Alphitobius diaperinus (Coleoptera: Tenebrionidae) é uma praga cosmopolita, originária da África, conhecida popularmente como cascudinho, que ataca uma grande variedade de produtos agrícolas armazenados. Foi introduzido em sistemas de produção animal, possivelmente, por meio de ração contaminada, dispersando-se e adaptando-se rapidamente às condições dos aviários. É considerado, mundialmente, como uma das principais pragas da avicultura e de difícil controle, causando prejuízos ao setor avícola, por ser vetor de várias doenças. Diversos métodos têm sido utilizados para o controle dessa praga, principalmente, o uso de produtos químicos, como os piretroides e organofosforados. Porém, devido aos riscos de intoxicação e de contaminação do meio ambiente, assim como o desenvolvimento de indivíduos resistentes a esse pesticida, outras abordagens para o controle de *A. diaperinus* têm sido abordadas, como o uso de semioquímicos. O uso de semioquímicos tem sido utilizado como atrantes alimentares em armadilhas para monitoramento e captura de insetos praga. Por outro lado, a avaliação de óleos essenciais (OE) de plantas nativas, pode contribuir para a descoberta de compostos úteis como repelentes ou bioinseticidas naturais, gerando ferramentas úteis no manejo integrado de pragas (MIP). O objetivo desse estudo foi investigar e identificar os compostos orgânicos voláteis liberados pelas aves, cama aviária, ração composta e componentes da ração, que possam causar a atração dessa praga para os aviários, causando grandes infestações, a fim de promover a prospecção de compostos naturais com potencial para aplicação no manejo integrado dessa praga em aviários. Assim como avaliar a atividade repelente do óleo essencial (OE) dos frutos maduros de *Schinus terebinthifolius* contra adultos de *A. diaperinus*, a fim de promover a prospecção de compostos naturais com potencial para aplicação no manejo integrado dessa praga em ambientes de aves. A atividade dos extratos preparados por extração com solvente, após aeração, foi avaliada em bioensaios comportamentais em olfatômetro em Y, dupla escolha, enquanto o isolamento e identificação dos compostos bioativos foram realizados pelas técnicas de cromatografia gasosa acoplada à eletroantenografia e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Foram selecionados os seguintes compostos provenientes da aeração das aves e do ambiente das aves (cama aviária): Nonanal, 4-Etilbenzaldeído, 4-Etilacetofenona e Geranilacetona. As análises por CG-EAG e CG-EM da aeração da ração composta e dos componentes da ração (grãos de milho e soja e a farinha de carne), os mesmos compostos foram identificados como bioativos. Esses compostos foram comparados com padrões sintéticos e foram testados individualmente em misturas, através de bioensaios em olfatômetro tubo em Y. Três compostos demonstraram atividade atraente quando testados individualmente e 1 composto atividade repelente. Mas quando combinados, as misturas contendo 4-ethylbenzaldeído, 4-ethylacetofenona, nonanal e geranilacetona (mistura 1), 4-ethylbenzaldeído e 4-ethylacetofenona (mistura 2) e o nonanal, 4-ethylbenzaldeído e 4-ethylacetofenona (mistura 3) também apresentaram atividade de atração neste inseto. A atividade do OE extraído por arraste a vapor dos frutos maduros de *S. terebinthifolius* (3 repetições) colhidos de plantas localizadas no campus A. C. Simões da UFAL, Maceió-AL, sobre adultos de *A. diaperinus* foi testada em bioensaios em olfatômetro de dupla escolha, em duas concentrações (1 e 10 µL). Uma mistura de padrões com os compostos atrativos, identificados na aeração das aves e da cama aviária (nonanal, 4-ethylbenzaldeído e 4-ethylacetofenona), foi testada de duas formas: junto com OE, tendo como controle o hexano; e a outra, a mistura foi adicionada em um braço do olfatômetro e o OE no outro braço, em papel filtro. Enquanto a composição do OE foi analisada por CG-FID e CG-EM. Foi verificada maior repelência do OE na dose de 10 µL. A repelência foi confirmada quando foram testados com os compostos atrativos. Foram identificados 14 compostos no OE de *S. terebinthifolius*, sendo os componentes principais: β-pineno (49,8 %), α-pineno (33,49 %), 3-careno (5,85 %), germanceno-D (2,08 %) e bornileno (1,21 %). Os compostos atrativos identificados a partir da aeração das aves atuam como cairomônios para *A. diaperinus*, enquanto o OE de *S. terebinthifolius* possui atividade repelente contra essa praga, portanto os resultados aqui obtidos podem ser aplicados no desenvolvimento de bioprodutos para o manejo integrado de *A. diaperinus* dentro e ao redor de galpões aviários e de ambientes de armazenamento de grãos e rações, favorecendo a utilização racional de inseticidas.

Palavras-chave: Cascudinho, *Alphitobius diaperinus*, semioquímicos, cairomônios, cama aviária, pimenta rosa, óleo essencial

ABSTRACT

Alphitobius diaperinus (Coleoptera: Tenebrionidae) is a cosmopolitan pest, originally from Africa, popularly known as the killer, which attacks a wide variety of stored agricultural products. It was introduced into animal production systems, possibly by contaminated feed, dispersing and rapidly adapting to avian conditions. It is considered, worldwide, as one of the main plagues of poultry and difficult to control, causing damages to the poultry sector, being a vector of several diseases. Several methods have been used to control this pest, mainly the use of chemical products, such as pyrethroids and organophosphates. However, due to the risks of poisoning and contamination of the environment, as well as the development of individuals resistant to this pesticide, other approaches to the control of *A. diaperinus* have been addressed, such as the use of semiochemicals. The use of semiochemicals has been used as attractive foodborne traps for monitoring and catching pest insects. On the other hand, the evaluation of essential oils (OE) of native plants, can contribute to the discovery of useful compounds as natural repellents or bio-insecticides, generating useful tools in integrated pest management (IPM). The objective of this study was to investigate and identify the volatile organic compounds released by birds, avian litter, compound feed and feed components, which could cause the attraction of this pest to the aviaries, causing large infestations, in order to promote the exploration of natural compounds with potential for application in the integrated management of this pest in aviaries. As well as evaluating the essential oil (OE) repellent activity of mature fruits of *Schinus terebinthifolius* against adults of *A. diaperinus*, in order to promote the prospection of natural compounds with potential for application in the integrated management of this pest in poultry environments. The attractiveness of extracts prepared by solvent extraction, after aeration, was evaluated in behavioral bioassays in a double-choice Y olfactometer, while the isolation and identification of the bioactive compounds were performed by gas chromatography coupled to electroantennography and gas chromatography coupled to spectrometry of pasta. The following compounds were selected from the aeration of birds and the environment of the birds (avian bed): Nonanal, 4-Ethylbenzaldehyde, 4-Ethylacetophenone and Geranylacetone. The CG-EAG and CG-EM analyzes of aeration of the compound feed and feed components (corn and soybean meal and meat meal), the same compounds were identified as bioactive. These compounds were compared to synthetic standards and were individually tested in mixtures through bioassays on Y-tube olfactometer. Three compounds demonstrated attractive activity when individually tested and compounded with repellent activity. When combined, mixtures containing 4-ethylbenzaldehyde, 4-ethylacetophenone, nonanal and geranylacetone (mixture 1), 4-ethylbenzaldehyde and 4-ethylacetophenone (mixture 2) and nonanal, 4-ethylbenzaldehyde and 4-ethylacetophenone (mixture 3) were also combined presented attraction activity on this insect. The activity of OE extracted by steam-dragging of mature fruits of *S. terebinthifolius* (3 replicates) harvested from plants located on the AC Simões campus of UFAL, Maceió-AL, on adults of *A. diaperinus* was tested in bioassays in double-choice olfactometer, in two concentrations (1 and 10 μ L). A mixture of standards with the attractive compounds, identified in the aeration of birds and the avian bed (nonanal, 4-ethylbenzaldehyde and 4-ethylacetophenone), was tested in two ways: together with OE, having as control hexane; and the other, the mixture was added on one arm of the olfactometer and the OE on the other arm, on filter paper. While the OE composition was analyzed by CG-FID and CG-MS. Higher OE repellency was observed at a dose of 10 μ L. The repellency was confirmed when tested with the attractive compounds. A total of 14 compounds were identified in *S. terebinthifolius* OE, with the main components being β -pinene (49.8%), α -pinene (33.49%), 3-carene (5.85%), 2.08%) and bornylene (1.21%). The attractive compounds identified from the aeration of the birds act as kairomones for *A. diaperinus*, whereas the *S. terebinthifolius* OE has repellent activity against this pest, so the results obtained here can be applied in the development of bioproducts for the integrated management of *A. diaperinus* in and around poultry houses and grain and feed storage environments, favored the rational use of insecticides.

Key words: Mealworm, *Alphitobius diaperinus*, semiochemicals, kairomones, avian bed, pink pepper, essential oil

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Nomenclatura adotada para semioquímicos e critérios biológicos de classificação destes compostos.....	22
Figura 2:	Nomenclatura aplicada aos aleloquímicos, com base nos efeitos ecológicos de benefício/prejuízo que desencadeiam no emissor e no receptor do sinal químico.....	23
Figura 3:	Esquema de extração de voláteis.....	24
Figura 4:	Esquema de um cromatógrafo a gás.....	26
Figura 5:	Esquema de um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM)	27
Figura 6:	Representação esquemática de uma sensila olfativa de inseto (modificado de Chapman 1998).....	28
Figura 7:	Desenho esquemático do sistema de CG-EAD (Syntech, 2015).....	29
Figura 8:	Detalhe ampliado da interface do sistema de CG-EAD (Syntech, 2015).....	30
Figura 9:	Olfatômetro de dupla escolha (Y).....	31
Figura 10:	Olfatômetro de múltipla escolha.....	32

CAPÍTULO I

Figura 01:	Development stages of <i>Alphitobius diaperinus</i>	87
Figura 02:	<i>Alphitobius diaperinus</i> egg.....	88
Figura 03:	Different instars of <i>Alphitobius diaperinus</i>	89
Figura 04:	Sexual dimorphism in <i>Alphitobius diaperinus</i> pupae: A – male; B – female.....	90
Figura 05:	<i>Alphitobius diaperinus</i> adults: A) newly emerged, without chitin; B) adults with chitinised exoskeleton.....	130
Figura 06:	Chemical structure of (<i>E,Z</i>)-3,5-tetradecadienoic acid.....	131
Figura 07:	Chemical structure of R (+)-4-methyl-1-nonanol.....	131
Figura 08:	Chemical structure of methyl (R)-(E)-2,4,5 – tetradecatrienoate.....	131
Figura 9:	Chemical structures of the pheromone constituent of <i>A. diaperinus</i> : Limonene (1), (<i>E</i>)- β -ocimene (2), linalool (3), 2-nonanone (4), (<i>R</i>)-daucene (5), and (<i>E,E</i>)- α -farnesene (6).....	132

CAPÍTULO II

Figura 01:	Resposta comportamental de <i>Alphitobius diaperinus</i> ao extrato por aeração das aves e do ambiente com 01, 20 e 40 dias de vida.....	100
Figura 02:	Resposta comportamental de <i>Alphitobius diaperinus</i> ao extrato por aeração da ração composta, dos componentes individuais da ração e da ração composta mais os insetos.....	101
Figura 03	Perfil da resposta eletroantegráfica de adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i> ao extrato por aeração de aves com 1 dia de vida.	103
Figura 04	Perfil da resposta eletroantegráfica de adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i> ao extrato por aeração de aves com 20 dias de vida.....	103
Figura 05	Perfil da resposta eletroantegráfica de adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i> ao extrato por aeração de aves com 40 dias de vida.....	104
Figura 06	Resultados das respostas comportamentais de <i>Alphitobius diaperinus</i> aos compostos sintéticos.....	106

CAPÍTULO III

Figura 01	<i>Schinus terebinthifolius</i> , ramo com frutos.....	117
Figura 02	Cromatograma CG-FID do óleo essencial dos frutos maduros de <i>S. terebinthifolius</i> Raddi., com compostos principais em destaque: α -pineno (1), β -pineno (2), 3-careno (3), bornileno (4) e germancreno-D (5).....	121
Figura 03	Resultados dos bioensaios de comportamento de <i>Alphitobius diaperinus</i> com óleo essencial (OE), mistura dos padrões sintéticos + Óleo essencial (controle: hexano) e mistura dos padrões sintéticos + óleo essencial (controle: óleo aromático).....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Plantas com atividade inseticida contra <i>Alphitobius diaperinus</i>	20
-----------	---	----

CAPÍTULO I

Table 1:	Plants with insecticide activity against <i>Alphitobius diaperinus</i>	64
Table 2:	Chemical formulas of active compounds of insecticidal plants.....	65

CAPITULO II

Tabela 01	Compostos bioativos por aeração de aves com 1, 20 e 40 dias de vida, selecionados a partir das respostas registradas por CG-EAG e identificação por CG-EM.....	102
Tabela 02	Compostos eletrofisiologicamente ativos identificados em extratos de aeração do ambiente das aves (cama aviária).....	104
Tabela 03	Composição química da ração composta.....	105

CAPÍTULO III

Tabela 01	Composição química do óleo essencial dos frutos maduros de <i>Schinus terebinthifolius Raddi</i>	120
-----------	--	-----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Considerações gerais sobre o <i>Alphitobius diaperinus</i>.....	16
2.2	Os semioquímicos.....	21
2.3	Métodos empregados na extração e identificação de semioquímicos.....	23
2.3.1	Extração de voláteis.....	24
2.3.2	Separação e identificação de compostos voláteis por Cromatografia Gasosa e técnicas acopladas.....	25
2.4	Bioensaios comportamentais com <i>Alphitobius diaperinus</i>.....	30
	Referências.....	33
	CAPÍTULO I. CONTROLE DO CASCUDINHO (<i>Alphitobius diaperinus</i>, Coleoptera, Thenebrionidae) NA AVICULTURA: UMA REVISÃO.....	44
	Submission confirmation.....	45
	Title and authors.....	46
	Abstract.....	47
	Background.....	48
	<i>Alphitobius diaperinus</i>	49
	Impact and cutting effects of <i>Alphitobius diaperinus</i>.....	50
	Economical importance.....	51
	Biological cycle.....	53
	Egg.....	53
	Larvae.....	53
	Pupae.....	54
	Adults.....	55
	Control methods against <i>Alphitobius diaperinus</i>	56
	Physical control.....	56
	Alternative natural control methods related to physical control.....	57
	Chemical control.....	58
	Biological control.....	58
	Control using Products with plant origin.....	61
	Semiochemicals used in Integrated Pest Management.....	67
	Coleopteran pheromones, a pest of stored grains.....	69
	Conclusions and perspectives.....	70
	References.....	74

CAPÍTULO II: IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS PARA O CONTROLE DE <i>Alphitobius diaperinus</i> (COLEOPTERA) NA AVICULTURA.....		91
Submission confirmation		
	Title and authors.....	92
	Abstract.....	93
1	INTRODUÇÃO.....	94
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	95
2.1	Obtenção dos Insetos.....	95
2.2	Tubos coletores de COVs.....	95
2.2.1	Coleta dos Compostos voláteis nas aves e cama aviária (ambiente).....	96
2.2.2	Dessorção em laboratório do material coletado nos animais e cama aviária.....	96
2.3	Coleta dos Compostos voláteis (COVs) da ração e da cama aviária.....	96
2.3.1	Aeração da ração e de seus componentes	96
2.3.2	Aeração da ração com os insetos.....	97
2.3.3	Aeração do material da cama aviária realizada no laboratório.....	97
2.4	Bioensaios em olfatômetro.....	97
2.5	Cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia GC-EAG.....	98
2.6	Análises por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).....	99
2.7	Compostos Sintéticos.....	99
2.8	Análise Estatística.....	99
3	RESULTADOS.....	100
3.1	Bioensaio de comportamento em olfatômetro em Y.....	100
3.1.1	Respostas comportamentais do <i>Alphitobius diaperinus</i> aos extratos de aeração das aves.....	100
3.1.2	Respostas comportamentais do <i>Alphitobius diaperinus</i> aos extratos de aeração da ração, dos componentes da ração (soja, milho e farinha de carne) e da ração com os insetos.....	101
3.2	Análises por CG-EAG	101
3.3	Análises por CG-EM.....	102
3.4	Compostos orgânicos voláteis identificados por CG/EM em amostras da ração.....	104

3.5	Respostas comportamentais de <i>Alphitobius diaperinus</i> aos compostos sintéticos.....	105
4.0	DISCUSSÃO	106
5.0	CONCLUSÃO	109
	AGRADECIMENTOS	109
	REFERÊNCIAS	110

CAPÍTULO III. ATIVIDADE REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi (ANACARDIACEAE) CONTRA *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)......

		113
	RESUMO	114
	ABSTRACT	114
1.	INTRODUÇÃO	115
2.	MATERIAL E MÉTODOS	117
2.1.	Material vegetal e extração do óleo essencial	117
2.2	Análise do óleo essencial por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG-DIC) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	118
2.3.	Insetos	118
2.4	Bioensaios em olfatômetro	119
2.5	Análise estatística	119
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
3.1	Constituintes químicos do óleo essencial de <i>S. terebinthifolius</i>	120
3.2	Resposta comportamental de <i>Alphitobius diaperinus</i>	122
4	CONCLUSÃO	124
	AGRADECIMENTOS	124
5	REFERÊNCIAS	125
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	128

APÊNDICE A: FIGURAS DO ARTIGO I SUBMETIDO AO JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY.....

APÊNDICE B: FIGURAS RELATIVAS À PARTE EXPERIMENTAL DO CAPÍTULO II.....

130
133

1 INTRODUÇÃO

A avicultura industrial de corte é um dos setores de maior expressão no agronegócio brasileiro, e representa um importante segmento agroindustrial, é uma atividade dinâmica e avançada tecnologicamente. O Brasil conquista espaço cada vez maior no mercado externo e a avicultura nacional está em contínua expansão (PINTO; RIBEIRO; BERNARDI, 2007) (UBABEF, 2016). É o segundo maior produtor e o primeiro em exportação de carne de aves (EMBRAPA, 2017).

Na avicultura, os insetos-praga provocam danos econômicos significativos e o sistema de criação adotado oferece condições adequadas para o desenvolvimento de população de insetos. Dentre as principais pragas avícolas, destaca-se *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae), popularmente conhecido como cascudinho da cama de frangos e considerado o principal inseto-praga da avicultura mundial.

Alphitobius diaperinus (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) é uma espécie cosmopolita, originária da África. Esse inseto infesta, primariamente, farinhas e grãos, especialmente em unidades de armazenamento, sendo encontrado em diversos grãos (SPILMAN, 1991; FERREIRA, 2011). Essa praga migrou para os aviários, provavelmente, mediante a disponibilidade de alimentos estocados em fazendas vizinhas e, pode ser encontrado em grandes quantidades nesses ambientes, e causam sérios prejuízos econômicos à atividade avícola (CHERNAKI, 2004).

O cascudinho tem maior importância nas criações de aves destinadas à corte, devido ao sistema de criação utilizado: o piso é revestido por um material absorvente, serragem (maravalhas), bagaço de cana, palha de arroz, sabugo de milho, que misturado às fezes, excedente de ração e água, tornam o ambiente propício ao desenvolvimento deste inseto (SALIN *et al.*, 2000) (PINTO; RIBEIRO; BERNARDI, 2007), que pode afetar o desenvolvimento e saúde das aves, de forma direta ou indireta. Sua importância decorre dos efeitos deletérios provocados à cadeia de produção avícola nos âmbitos sanitários, por ser vetor de diversos patógenos como vírus, bactérias e fungos (ROCHE *et al.*, 2009) (LEFFER *et al.*, 2010) (OU; GIAMBRONE; MACKLIN, 2012) (HILBERT *et al.*, 2012).

Por conta de suas características comportamentais (migrar para a estrutura do galpão, formando túneis) e biológicas (ciclo de vida curto) que permitem sua proliferação, através da sua rápida multiplicação é considerada uma praga de difícil controle (SKOV *et al.*, 2004) (LEFFER *et al.*, 2010)(OU; GIAMBRONE; MACKLIN, 2012) (HILBERT *et al.*, 2012). Existem várias formas de controle, a maioria destes métodos está baseada na utilização de inseticidas químicos de curto período residual, cuja utilização causa redução populacional temporária e é limitada pela presença constante das aves nos aviários, além da possibilidade de ocasionar o aparecimento de resistência na praga e causar intoxicações aos animais e ao homem

(ALVES, L. F. A. *et al.*, 2004) (JAPP; BICHO; SILVA, 2010) (CHERNAKI-LEFFER, A. M. *et al.*, 2011a).

O manejo integrado de pragas tem sido adotado como alternativa mais sustentável em uma conjuntura de mercados cada vez mais exigentes e regulamentados, já que enfatiza a produção de alimentos saudáveis com a menor perturbação possível dos agroecossistemas e encoraja mecanismos naturais de controle de pragas (UE, 2009).

Diversos estudos apontam para o potencial de aplicação de métodos de controle, baseados nos semioquímicos, como o uso de cairomônios no manejo de pragas de produtos armazenados, destacando-se voláteis de grãos e cereais capazes de atrair várias espécies de coleópteros que infestam esses materiais. A comunicação por meio de compostos químicos é uma das formas mais importantes que os insetos exercem em suas relações ecológicas com o ambiente e com outros organismos (COX; COLLINS, 2001) (TREMATERRA, 2012).

Likhayo e Hodges (2000) realizaram um trabalho de monitoramento e captura de besouros das espécies *Sitophilus zeamais* e *Sitophilus oryzae* em celeiros no Quênia, na África, utilizando armadilhas contendo feromônio de agregação e grãos moídos de trigo, capturaram mais insetos que armadilhas com apenas um desses atraentes, demonstrando a ocorrência de sinergia entre os componentes da mistura feromonal e os voláteis liberados pelos grãos de milho.

Bartelt *et al.* (2009), realizaram um estudo em galpões contendo Perú (*Meleagris*) e relataram a identificação do feromônio de agregação do *Alphitobius diaperinus*, emitido pelos machos, composto por uma mistura de cinco componentes: limoneno, β -ocimeno, linalol, dauceno e 2-nonanona. As armadilhas contendo a mistura feromonal capturaram mais insetos do que o controle.

Singh e Johnson (2012) verificaram em estudo realizado em galpões aviários, nos Estados Unidos, que o feromônio sintético do *A. diaperinus* juntamente com outros atraentes voláteis presentes nas fezes de galinha, aumentou a captura em armadilhas, indicando a necessidade de mais estudos para prospecção de novas moléculas atraentes, assim como o potencial dos semioquímicos como ferramenta para o manejo integrado dessa praga tanto na avicultura como em ambientes de armazenamento.

Hassemer *et al.* (2016) estudou uma população brasileira de *A. diaperinus* e encontrou como feromônio na mistura de 6 compostos, cinco dos quais já descritos para a população estudada nos Estados Unidos (SINGH; JOHNSON, 2012) e o (*E,E*)- α -farneseno. Esses compostos mostraram atratividade para ambos os sexos em bioensaios de comportamento. Em outros estudos, com coleópteros, o (*E,E*)- α -farneseno foi identificado como cairomônio (RODRIGUEIRO, 2010) (MARQUES *et al.*, 2013) (YASUI *et al.*, 2008) e Hymenoptera (MICHEREFF *et al.*, 2011). Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi investigar e identificar os compostos orgânicos voláteis liberados pelas aves, cama aviária (ambiente), ração

e componentes da ração (grãos de milho, farelo de soja e farinha de carne) com atratividade para adultos de *A. diaperinus*, a fim de promover a prospecção de compostos naturais com potencial para aplicação no manejo integrado dessa praga em ambientes de aves e armazenamento de grãos. Assim como avaliar a atividade repelente do óleo essencial (OE) dos frutos maduros de *Schinus terebinthifolius* contra adultos de *A. diaperinus*, a fim de promover a prospecção de compostos naturais com potencial para aplicação no manejo integrado dessa praga em ambientes de aves. Deste modo, esta tese foi organizada em três capítulos, os quais foram redigidos sob o formato de artigos científicos:

- O primeiro capítulo é um artigo de revisão bibliográfica sobre *A. diaperinus*, sua biologia, importância no contexto da avicultura, métodos de controle e perspectivas no manejo dessa praga, o qual foi submetido à Revista Journal of Animal Science and Biotechnology (ISSN: 2049-1891).
- O segundo capítulo é um artigo de pesquisa original que trata da investigação, isolamento e identificação de caimônios das aves, do ambiente de frangos de corte e da ração, que foi submetido à Revista Pest Management Science (ISSN: 1526-4998).
- O terceiro e último capítulo também é um artigo de pesquisa original sobre a avaliação da atividade do óleo essencial de frutos maduros de *S. terebinthifolius* sobre adultos de *A. diaperinus*, o qual será submetido a Revista Pest Management Science (ISSN: 1526-4998).

Os capítulos estão precedidos de uma revisão de literatura sobre os temas abordados durante a pesquisa, conforme instruções normativas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia. A bibliografia citada na introdução está compilada em conjunto com as referências bibliográficas da revisão de literatura a seguir.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre *Alphitobius diaperinus*

Alphitobius diaperinus (Coleoptera: Tenebrionidae), conhecido como cascudinho, é uma espécie cosmopolita, originário da África, antes considerada uma praga secundária de grãos armazenados. Esse inseto infesta farinhas e grãos, especialmente em unidades de armazenamento, sendo encontrado em diversos grãos como no milho e amendoim (SPILMAN, 1991; FERREIRA, 2011).

Foi introduzido nos sistemas de produção animal, possivelmente, por meio de ração contaminada, dispersando-se e adaptando-se rapidamente às condições dos aviários, é considerado, mundialmente, como uma das principais pragas da avicultura moderna, por causar sérios problemas nas instalações e nas aves (BICHO *et al.*, 2005) (CAMARGO NETO *et al.*, 2006) (JAPP; BICHO; SILVA, 2010). Essa praga migrou para os aviários, provavelmente, mediante a disponibilidade de alimentos estocados em fazendas vizinhas e, pode ser encontrado em grandes quantidades nos aviários, e causando sérios prejuízos econômicos à atividade avícola (CHERNAKI, 2004).

O sistema de confinamento utilizado para a criação de aves proporcionou ao *A. diaperinus* um habitat ideal para a sua multiplicação e conseqüente crescimento populacional, devido ao uso da cama aviária, que favorece aos insetos substrato para alimentação e abrigo a luz solar, transformando-o em um problema mundial, tornando-se praga primária que afeta vários tipos de sistemas de produção de aves (RODRIGUEIRO, 2010).

É considerada uma praga de difícil controle, por conta de suas características comportamentais e biológicas que permitem sua proliferação, pois uma vez estabelecidos, multiplicam-se rapidamente, sendo encontradas elevadas populações em cama de frangos de corte, de matrizes, e mesmo em fezes de poedeiras de ovos comerciais confinadas em gaiolas. Além de ser um carreador e propagador de agentes patógenos, causam grandes prejuízos econômicos e sanitários à avicultura (SKOV, 2004; LEFFER *et al.*, 2010; GIAMBRONE; MACKLIN, 2012).

Dentre os agentes patogênicos transmitidos pelo cascudinho, destacam-se as bactérias, vírus, fungos, protozoários e parasitas, que causam grandes problemas sanitários na avicultura como o vírus do gênero Avulavirus, que causa a doença de Newcastle, o fungo *Aspergillus* spp. que produz toxinas como a aflotoxina B₁ (SKOV, 2004; LEFFER *et al.*, 2010; GIAMBRONE; MACKLIN, 2012; HILBERT *et al.*, 2012).

Os estudos desenvolvidos visando a biossegurança de produtos de origem animal e a biosseguridade dos plantéis, devido ao papel do *A. diaperinus* como vetor de várias doenças, principalmente, a salmonelose, que causa distúrbios gastrointestinais severos às aves,

diminuindo o ganho de peso e prejudicando a produção avícola, além de contaminar a carne causando infecção ao homem através de sua ingestão (DAVILA; REBOLLO; TELLEZ, 1996) (ROCHE *et al.*, 2009) (LEFFER *et al.*, 2010) (HOELZER; SWITT; WIEDMANN, 2011) (HILBERT *et al.*, 2012).

Outro fator relevante é que as aves, principalmente em idades jovens, substituem a ração balanceada por estágios larvais e adultos de *A. diaperinus*, em razão do comportamento que possuem de ciscar e comer qualquer material em movimento (JAPP; BICHO; SILVA, 2010). A ingestão de insetos adultos, os quais possuem exoesqueleto e élitros rígidos, pode causar lesões no trato gastrointestinal, deixando-o vulnerável à entrada de patógenos (CHERNAKI; ALMEIDA, 2001)(JAPP; BICHO; SILVA, 2010).

O controle do cascudinho é considerado difícil, pelo fato de apresentar ciclo de vida relativamente curto e comportamento que favorece reinfestações, pois abriga-se em fendas, rachaduras, abaixo dos comedouros e do solo, e próximo aos pilares de sustentação dos galpões (CHERNAKI-LEFFER, A. *et al.*, 2002)(CHERNAKI-LEFFER *et al.*, 2001). O controle físico consiste no manejo e desinfecção do aviário, baseado na utilização de fogo, inundação e no manejo da temperatura, pois altas temperaturas ajudam a controlar o cascudinho. O intervalo entre lotes e vazio sanitário, é a principal época para o controle desta espécie nos aviários, momento que as temperaturas podem ser elevadas para acima de 45° C, com o fechamento das cortinas (REZENDE *et al.*, 2009).

De forma geral, os inseticidas apresentam alguns problemas como seleção de populações de insetos resistentes, intoxicação ao homem, contaminação do ambiente e das aves, tornando-se uma barreira comercial para exportação de carne, pois a União Européia não permite o uso de determinados produtos químicos para o controle de insetos (ALVES, L. F. A. *et al.*, 2004) (JAPP; BICHO; SILVA, 2010) (CHERNAKI-LEFFER, A. M. *et al.*, 2011b). O controle químico está baseado na utilização de inseticidas químicos de curto período residual, cuja utilização causa redução populacional temporária e é limitada pela presença constante das aves nos aviários. Este método de controle é realizado através de pulverizações com inseticidas a cada saída das aves no final do lote. É aplicado nas paredes, pilares, vigas, travessas e tesouras, muretas, beirais, caixas de ração e piso (CHERNAKI; ALMEIDA, 2001) (HAMM *et al.*, 2008).

O controle biológico de pragas é realizado com utilização de meios naturais como o uso de organismos vivos, que visam à exploração de nematoides, bactérias e fungos, com destaque na aplicação de entomopatógenos, principalmente, pela segurança às aves, pois fungos entomopatogênicos são considerados seguros tanto para o homem como para o ambiente, não oferecendo risco aos animais homeotérmicos (MATSUO *et al.*, 2011) (PEREIRA; ALVES 1998) (ALVES, LUIS F A; ROHDE; ALVES, 2005).

A *Beauveria bassiana* é um dos agentes mais promissores para o controle biológico de artrópodes, porque persiste na população hospedeira, leva a altas taxas de mortalidade em larvas e adultos, e é facilmente pulverizado. No entanto, a ação de fungos entomopatogênicos é lenta e a maioria necessita de condições apropriadas de temperatura e umidade para manter a sua viabilidade e patogenicidade. Não há estudos suficientes para avaliar o potencial desses fungos em controlar os insetos nos galpões avícolas. *B. bassiana* é um fungo encontrado comumente infectando insetos, e seu uso como entomopatógeno tem uma grande vantagem sobre os pesticidas convencionais, pois persiste na população hospedeira, reduz sua longevidade e ocasiona altas taxas de mortalidade em larvas e adultos das populações de insetos (ALVES et al., 2005).

Nematoides entomopatogênicos como *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Steinernematidae) já foram avaliados em larvas e adultos de cascudinhos, verificando-se que as larvas foram mais susceptíveis que os adultos e que o nematoide *S. carpocapsae* apresentou patogenicidade superior ao *S. glaseri* (ALVES et al., 2005). Eles também agem em associação com bactérias, em uma relação simbiótica, e localizam o hospedeiro através de diferentes estratégias de busca, invadindo-os pelas aberturas naturais do inseto (boca, espiráculos ou abertura anal). Quando atingem o hemocele do inseto, liberam as bactérias associadas, as quais matam o hospedeiro em 24 e 72 horas após a invasão (AGUILLERA et al., 2001).

A terra diatomácea (TD) é outro produto que vem sendo estudado como controle alternativo de *A. diaperinus*. A terra diatomácea é um pó inerte composto por carapaças de algas diatomáceas fossilizadas, que aderem à epicutícula dos insetos e atuam por abrasão e adsorção de lipídios epicuticulares, matando os insetos por desidratação (EBELING, 1971) (KORUNIC, 1998).

Nos últimos anos, a procura de métodos naturais para o controle de pragas teve um empenho enorme na procura de novas plantas e/ou novos usos para plantas já descritas como possuidoras de atividade inseticida. Esta é uma alternativa valiosa ao uso do inseticida químico sintético. Os óleos essenciais são constituídos de moléculas pequenas e voláteis. São classificados como metabólitos secundários de plantas e são misturas de moléculas complexas que têm sido amplamente pesquisados para o estudo de suas propriedades repelentes e inseticidas de contato (JIN et al., 2010) (STEFANAZZI; STADLER; FERRERO, 2011)(JIANG et al., 2012).

Marcomini et al. (2005) testaram, em laboratório, um extrato aquoso de menta (*Mentha* sp.) (Labiatae) e extratos etanólicos de alfavaca (*Ocimum* sp.) (Lamiaceae), batata yácon (*Smallanthus sonchifolius*) (Asteraceae), cipóde-são-joão (*Pyrostegia venusta*) (Bignoniaceae), eucalipto (*Eucalyptus* sp.) (Myrtaceae), pau-fava (*Senna macranthera*) (Fabaceae), para o controle de *A. diaperinus* (Tabela 1). De acordo com os autores, houve mortalidade significativa

na fase larval para os extratos de alfavaca e de cipó-de-são-joão, superiores a 40%. Para adultos, apenas o extrato de eucalipto ocasionou mortalidade superior a 26%.

Tabela 1: Plantas com atividade inseticida contra *Alphitobius diaperinus*

Planta (nome vulgar)	Espécie da planta	Família	Compostos ativos	Tipo de extrato
Alfavaca	<i>Ocimum sp.</i>	Lamiaceae	Eugenol	Extrato bruto
Batata yácon	<i>Smallantus sanchifolius</i>	Asteraceae	Frutano, ácido clorogênico	Extrato bruto
Cipó de-são-jão	<i>Pyrostegia venusta</i>	Bignoniaceae	alantoína, esteróides b-sitosterol, taninos	Extrato bruto
Citronela	<i>Cymbopogon wynterianus Jowitt</i>	Poaceae	monoterpenos acíclicos, citronelal , geraniol e citronelol	Óleo Essencial
Eucalipto	<i>Eucaliptus sp</i>	Myrtaceae	Terpenos, canfeno, limoneno, mirtenol, borneol e taninos	Extrato bruto
Menta	<i>Mentha sp</i>	Labiatae	Menthol	Óleo Essencial/Extrato bruto
Nim	<i>Azadirachta indica A. Juss</i>	Meliaceae	Azadiractina	Óleo Essencial
Pau-fava	<i>Senna macranthera</i>	Fabaceae Caesalpinioideae	Crisofanol	Extrato bruto
Timbó	<i>Derris urucu</i>	Fabaceae	Rotenona	

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) é um sistema de controle que procura preservar e aumentar os fatores de mortalidade natural das pragas pelo uso integrado dos métodos de controle selecionados com base em parâmetros técnicos, econômicos, ecológicos e sociológicos, de forma que mantém as pragas sempre abaixo do nível em que causam “danos econômicos” (AMBROGI *et al.*, 2009)(ZARBIN, 2009; (PICANÇO, 2010). A comunicação por meio de compostos químicos é uma das formas mais importantes que os insetos exercem em suas relações ecológicas com o ambiente e com outros organismos.

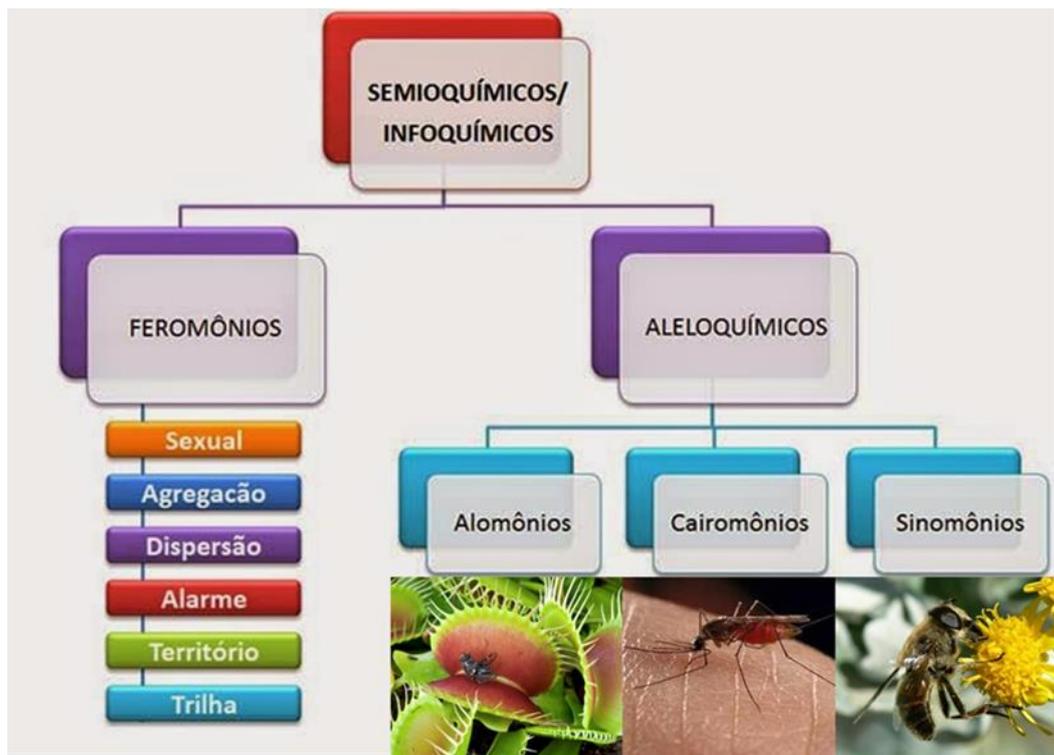
A comunicação química estabelecida entre os organismos é feita com o auxílio de substâncias voláteis, as quais são biossintetizadas e liberadas pelo emissor e captado e assimilado pelo receptor que, por sua vez, pode sofrer uma resposta imediata ou em longo prazo, promovendo alterações em seu comportamento ou em sua fisiologia, que são chamados de semioquímicos (PAIVA; PEDROSA-MACEDO, 1985).

2.2 Os semioquímicos

Os semioquímicos agem como desencadeadores de reações fisiológicas e comportamentais específicas. São compostos químicos que medeiam à interação entre organismos (LAW; REGNIER, 1971) e que influenciam fortemente o comportamento dos insetos, pois eles usam esses sinais químicos (= semioquímicos, do grego *semio* = sinal) nos processos mais importantes de sua vida: para encontrar alimento, parceiros para reprodução, locais de oviposição, detectar a presença de inimigos (COX; COLLINS, 2001). Por esse motivo, os semioquímicos são considerados uma ferramenta promissora para o controle de pragas de produtos armazenados em estratégias de manejo integrado, que são divididos em feromônios e aleloquímicos (TREMATERRA, 2012).

Os feromônios são ferramentas seguras e de alta tecnologia, sendo possível o controle de populações de insetos por meio da manipulação da comunicação química, sem afetar organismos benéficos. São semioquímicos que disseminam informações entre indivíduos da mesma espécie e, de acordo com o tipo de resposta que desencadeiam nos indivíduos receptores, podem ser classificados em sexual, de trilha, de alarme ou de agregação, figura 1 (ZARBIN *et al.* 2009; MORI 2013).

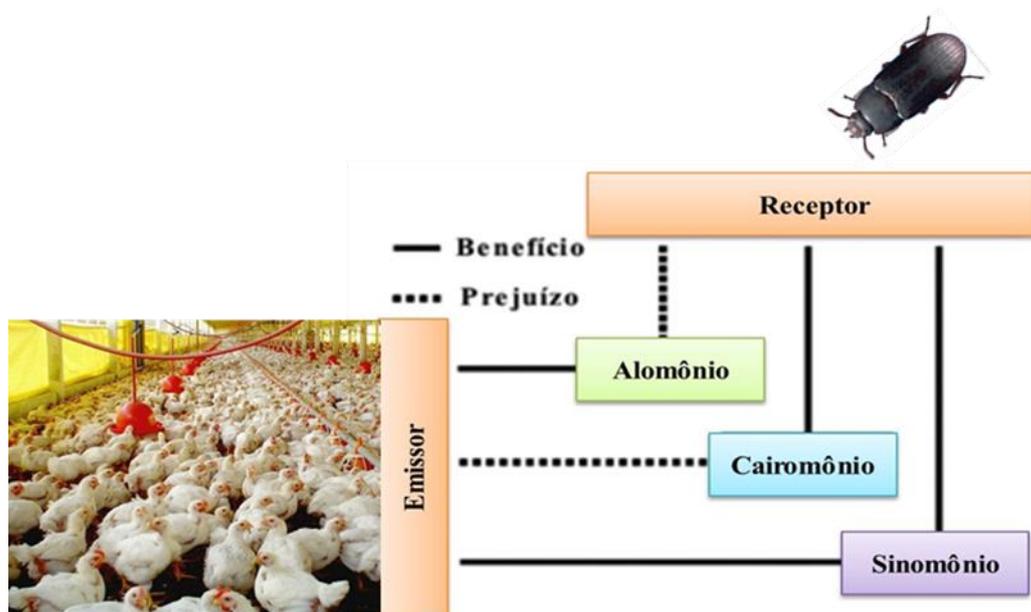
Figura 1: Nomenclatura adotada para semioquímicos e critérios biológicos de classificação destes compostos.



Adaptado de MORI (2013).

Já o termo aleloquímico se refere ao semioquímico que medeia à comunicação entre indivíduos de espécies diferentes. Um aleloquímico é classificado de acordo com o ganho ou prejuízo ecológico que gera para o emissor e também para o receptor, podendo ser considerado um alomônio, cairomônio ou sinomônio (MORI 2013), conforme ilustrado na Figura 2.

Figura 2: Nomenclatura aplicada aos aleloquímicos, com base nos efeitos ecológicos de benefício/prejuízo que desencadeiam no emissor e no receptor do sinal químico.



Autora, 2018.

Os compostos orgânicos voláteis provenientes de plantas são utilizados pelos insetos fitófagos como cairomônios, e podem constituir atraentes alimentares eficientes para serem usados no monitoramento e captura de insetos praga de produtos armazenados. Esses compostos liberados pelas plantas podem atrair insetos adultos de ambos os sexos e aumentar sinergisticamente a eficiência de armadilhas de feromônio (COX, 2004).

2.3 Métodos empregados na extração e identificação de semioquímicos

A preparação de amostras para o processo de identificação dos semioquímicos é de fundamental importância, para obtenção de informações representativas do perfil volátil característico de uma matriz, seja ela animal ou vegetal, evitando contaminações ou formação de artefatos, já que qualquer modificação causada na composição dos voláteis da amostra nesta etapa inicial não mais poderá ser corrigida nas etapas subsequentes.

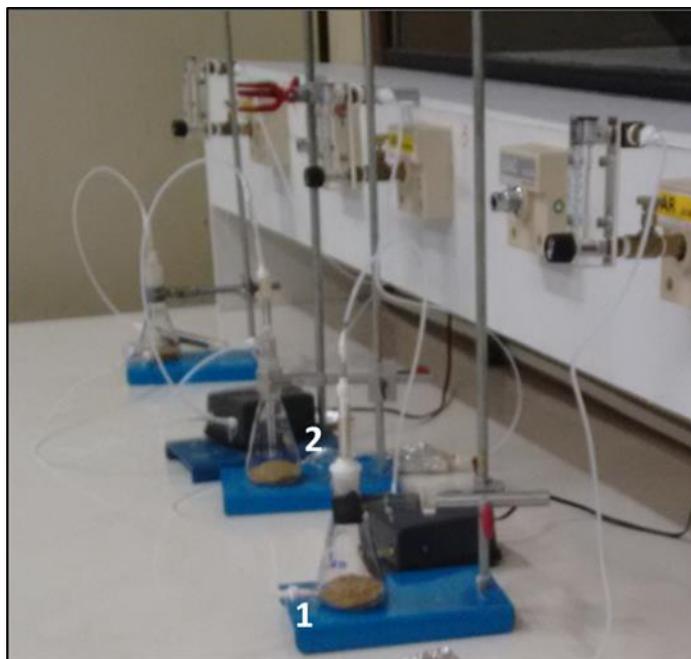
A análise de compostos voláteis requer tecnologias e métodos analíticos capazes de avaliar a composição de um extrato, e também de examinar pequenas variações, detectar compostos presentes em baixas concentrações (BICCHI et al., 2011).

2.3.1 Extração de voláteis

É um método de captura de voláteis, que pode ser realizado em plantas, insetos ou outros animais em concentrações similares às encontradas na natureza, uma vez que a fonte pode ser mantida viva durante o processo de extração, especialmente quando as condições experimentais são mantidas o mais próximo do natural possível. Trata-se de uma técnica de extração muito sensível e seletiva (de acordo com o adsorvente escolhido), em que somente os compostos voláteis produzidos pela matriz são coletados (AGELOPOULOS et al., 1999; OMAR et al., 2016). Os compostos são adsorvidos em polímeros sintéticos sólidos, como porapak, tena ou super Q, carvão ativado, entre outros.

A matriz é confinada em um recipiente fechado e um gás (geralmente ar purificado) é bombeado (*purge*) de forma contínua através da amostra. Os voláteis liberados pela amostra são então carregados pelo gás e uma armadilha contendo material adsorvente (*trap*) coleta e concentra os compostos voláteis, figura 3 (KREMSER et al., 2016). Após esta etapa, os analitos são recuperados por dessorção química, pela eluição com solventes de alta pureza (diclorometano, hexano e éter etílico), ou térmica, realizada pelo aquecimento do injetor do cromatógrafo a gás, permitindo a análise direta do extrato pelas técnicas de cromatografia gasosa e espectrometria de massas (BICCHI et al., 2011; KREMSER et al., 2016).

Figura 3: Esquema de extração de voláteis



1 – abertura inferior, entrada de ar; 2 – abertura superior, encaixe do trape contendo o adsorvente.

2.3.2 Separação e identificação de compostos voláteis por Cromatografia Gasosa e técnicas acopladas.

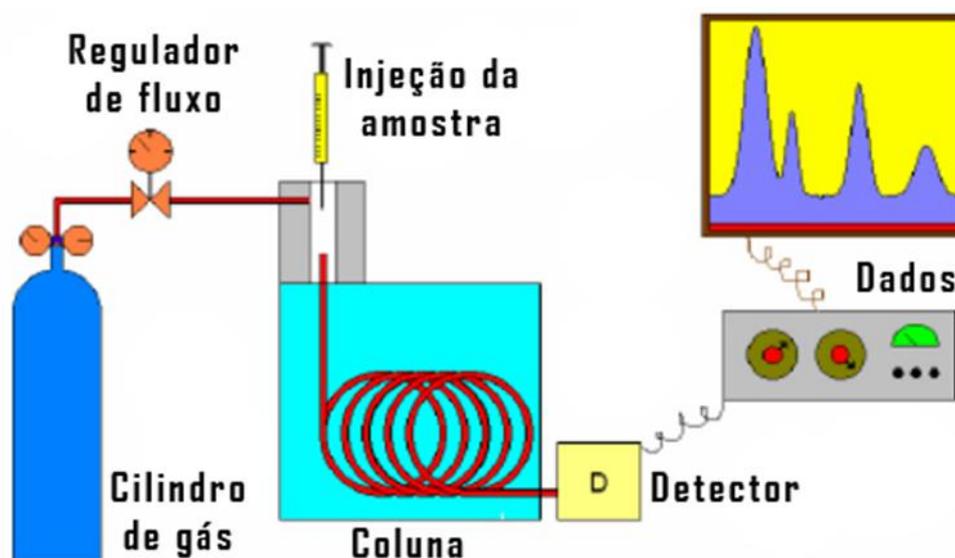
A Cromatografia gasosa (CG) é definida como uma técnica empregada para separação e identificação de diferentes compostos, principalmente os terpenos de baixo peso molecular. A separação está baseada na distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária sólida ou líquida e uma fase móvel gasosa. É considerada como uma técnica que tem excelente capacidade de separação, e também oferece alta sensibilidade e seletividade, quando a associado à espectrometria de massas (GARCIA-VILLALBA et al., 2011). A cromatografia gasosa possui, além do seu alto poder de resolução, a oportunidade de detecção em escala de nano e picograma (10⁻⁹-10⁻¹² g). É aplicada para separação de gases ou de compostos volatilizáveis termicamente estáveis (PEREIRA; AQUINO NETO, 2000; AQUINO NETO, 2003; COLLINS et al., 2006).

Na fase móvel os gases usados, são denominados de gás de arraste ou gás carreador, devem possuir algumas características, tais como; alto grau de pureza, serem inertes em relação à fase estacionária e compatível com o detector. Os gases mais utilizados são hidrogênio e hélio. A amostra é injetada através de microseringa com agulhas de pontas hipodérmicas, de forma manual ou com injetores automáticos. A injeção pode ser realizada com ou sem divisão de fluxo. A injeção com divisão proporciona vantagem de garantir uma banda estreita da amostra inicial e também uma quantidade de amostra compatível com as colunas capilares, de maneira a garantir uma melhor resolução da cromatografia. No entanto para soluções mais diluídas, a injeção sem divisão de fluxo é mais indicada. Além disso, devido ao fato da transferência da amostra para a coluna ser mais lenta, indica-se o uso de mecanismos de reconcentração da amostra de maneira a diminuir o alargamento dos picos cromatográficos (AQUINO NETO, 2010).

Os principais componentes de um cromatógrafo a gás estão esquematizados na Figura 4. De acordo com Penteado et al. (2008), a análise por CG inicia-se com a introdução da amostra no injetor aquecido (com o auxílio de uma microseringa), onde é vaporizada e transferida pelo gás de arraste para a coluna cromatográfica colocada dentro de um forno pré-aquecido. Seguindo uma programação ou rampa de temperatura previamente ajustada no equipamento, os componentes da amostra são eluídos e conduzidos para o detector conectado na saída da coluna, o qual emite um sinal elétrico que é registrado graficamente sob a forma de picos, gerando o cromatograma. Cada componente é separado pela diferença nas suas propriedades termodinâmicas (pontos de ebulição) e também pela distribuição diferenciada na fase estacionária e móvel (gás carreador) por diferenças de polaridade (XUE et al., 2015). Os

detectores mais utilizados são o detector de ionização em chama (FID) (Figura 4) e o espectrômetro de massas (Figura 5).

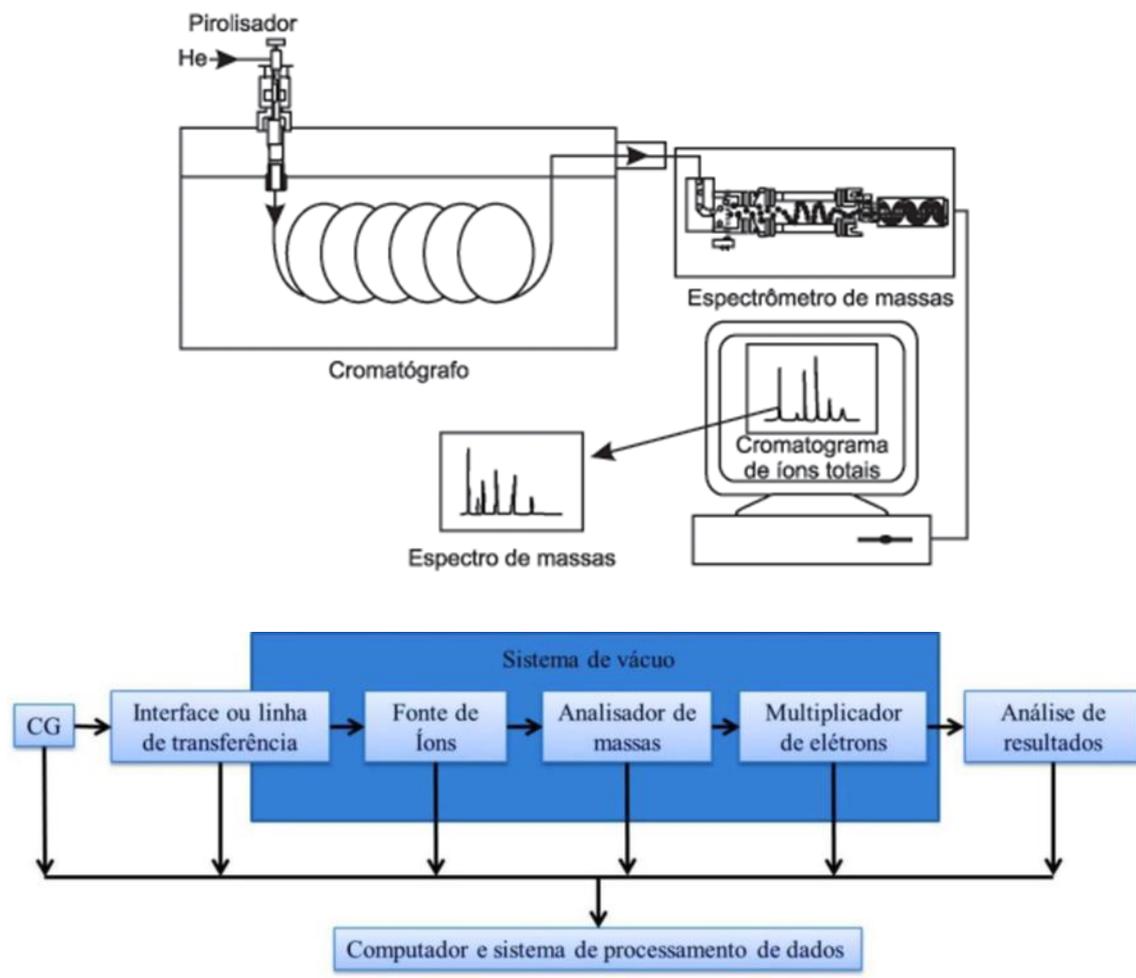
Figura 4: Esquema de um cromatógrafo a gás



A CG pode ser utilizada de forma integrada – acoplada ou “hifenada” - com outras técnicas analíticas de identificação de compostos. Na ecologia química de insetos, o isolamento e a identificação de semioquímicos têm sido realizados principalmente pela utilização de CG acoplada a técnicas de espectrometria de massas (EM) e eletroantenografia (EAG), contribuindo para significantes progressos nas áreas de agricultura e manejo de pragas, assim como de entomologia forense e estudos com insetos vetores (COSSÉ et al., 1995; NYASEMBE et al., 2012; BALA; SHARMA, 2016; YANG et al., 2016).

A técnica de CG-EM separa misturas químicas em componentes individuais (CG) e possibilita a identificação desses componentes a nível molecular (EM), sendo considerada uma das ferramentas mais acuradas e eficientes para analisar amostras orgânicas voláteis. Quando os analitos vaporizados emergem separadamente da coluna cromatográfica, eles são transportados através de uma interface ou linha de transferência pelo gás carreador aquecido (hélio, por exemplo) (Figura 5).

Figura 5: Esquema de um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM).



Adaptado de: Guo e Lankmayr (2012).

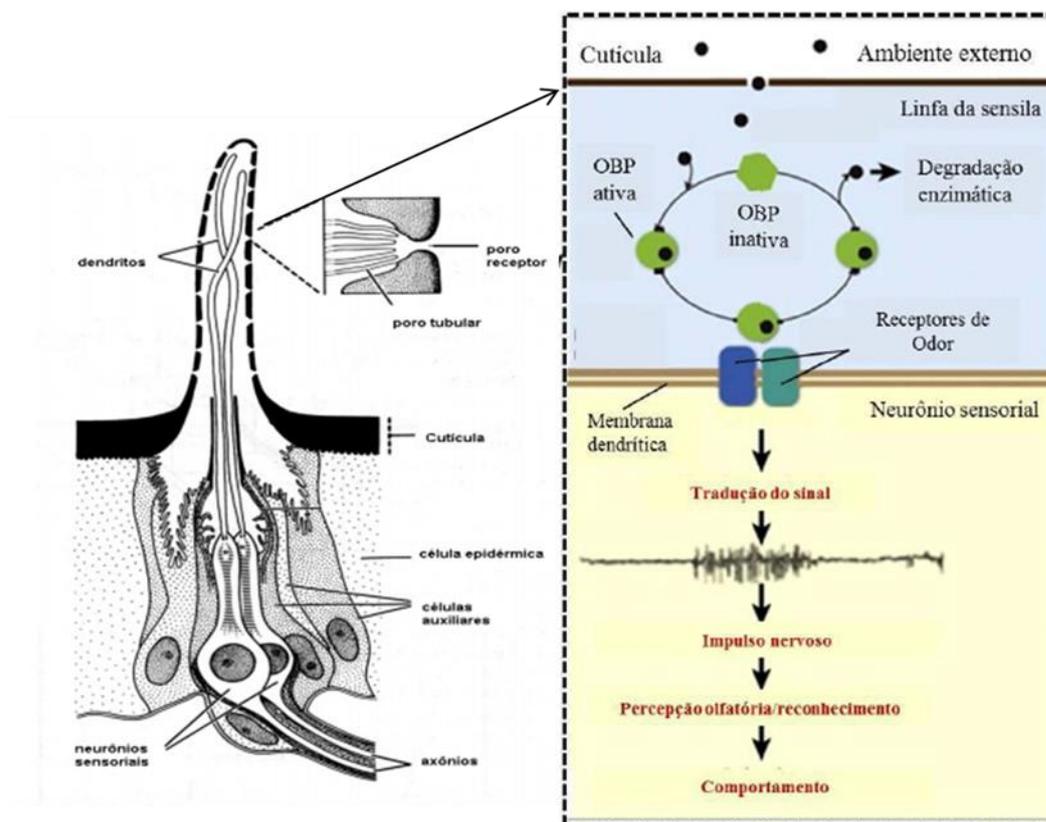
A CG-EM fornece mais informação sobre a composição e estrutura de uma substância a partir de pequenas quantidades de amostra que as demais técnicas analíticas. Apesar disso, em alguns casos, informações adicionais obtidas por espectroscopia no infravermelho e por ressonância magnética nuclear ainda podem ser necessárias para identificação precisa de determinados compostos (MCLAFFERTY; SENKO, 1994).

Já o sistema de detecção eletrofisiológico – EAG ou EAD, do inglês *electroantennographic detector* – foi descrito pela primeira vez em 1969, por Moorhouse e colegas. É uma técnica que utiliza a antena do inseto como biosensor na identificação de moléculas eletroativas para o inseto, pois a principal estrutura de detecção de pistas químicas voláteis é a antena e, tendo em vista que os potenciais elétricos são à maneira de transmissão de informação no sistema nervoso, figura 6 (OLSON; HANSSON, 2013).

A antena ou mesmo a cabeça do inseto pode ser fixada entre dois eletrodos, conectado a um amplificador e um registrador, de modo que a antena funciona como um elemento sensitivo, ou mais precisamente, como um detector biológico. E quando a antena recebe um “puff” de estímulo químico ao qual tenha sensibilidade há uma variação no potencial elétrico que é registrado, figuras 7 e 8. É o registro das mudanças no potencial elétrico entre as parte distal e proximal da antena, causado pelo estímulo olfatório. Este, por sua vez, é detectado por neurônios sensoriais olfatórios localizados em estruturas cuticulares da antena chamadas sensilas (ZARBIN, 2001; OLSON; HANSSON, 2013; SYNTECH, 2015).

Além disso, também é possível verificar a resposta eletrofisiológica de apenas uma sensila (*single sensillum recording*) e de seus neurônios sensoriais, através de um eletrodo colocado em contato com a região da linfa extracelular receptora, sendo esta técnica útil no mapeamento de proteínas receptoras olfatórias dos neurônios (OLSON; HANSSON, 2013).

Figura 6: Representação esquemática de uma sensila olfativa de inseto (modificado de Chapman 1998).



Na técnica de CG-EAG, após a amostra percorrer toda a coluna cromatográfica, o efluente é dividido (*split*) de forma que uma parte de cada composto vai para o FID, gerando o cromatograma da amostra, enquanto a outra é lançada sobre a antena preparada no EAG por meio de uma linha de transferência aquecida, com um suave fluxo de ar sintético umidificado e as respostas amplificadas e registradas geram o eletroantenograma (Figuras 7 e 8). As duas detecções ocorrem simultaneamente, possibilitando identificar qual composto da amostra é ativo (ZARBIN, 2001). Diversos estudos relatam a identificação de cairomônios para insetos praga por meio do emprego da técnica de CG-EAG (WEBSTER et al., 2008; MENDESIL et al., 2009; BENDERA et al., 2015), mostrando sua importância na elucidação dos semioquímicos envolvidos no processo de localização do hospedeiro por essas espécies, que gera conhecimento aplicável no desenvolvimento de ferramentas de manejo integrado de pragas.

Figura 7: Desenho esquemático do sistema de CG-EAD (Syntech, 2015).

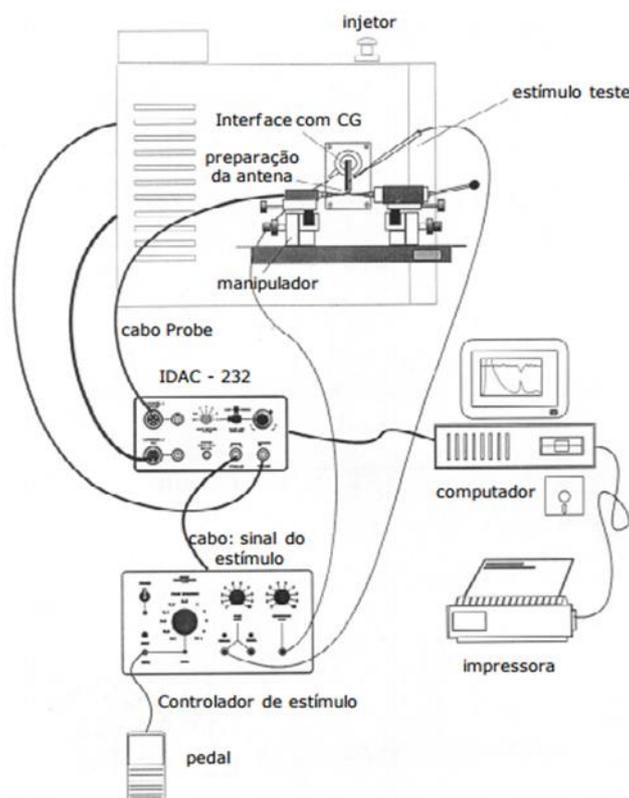
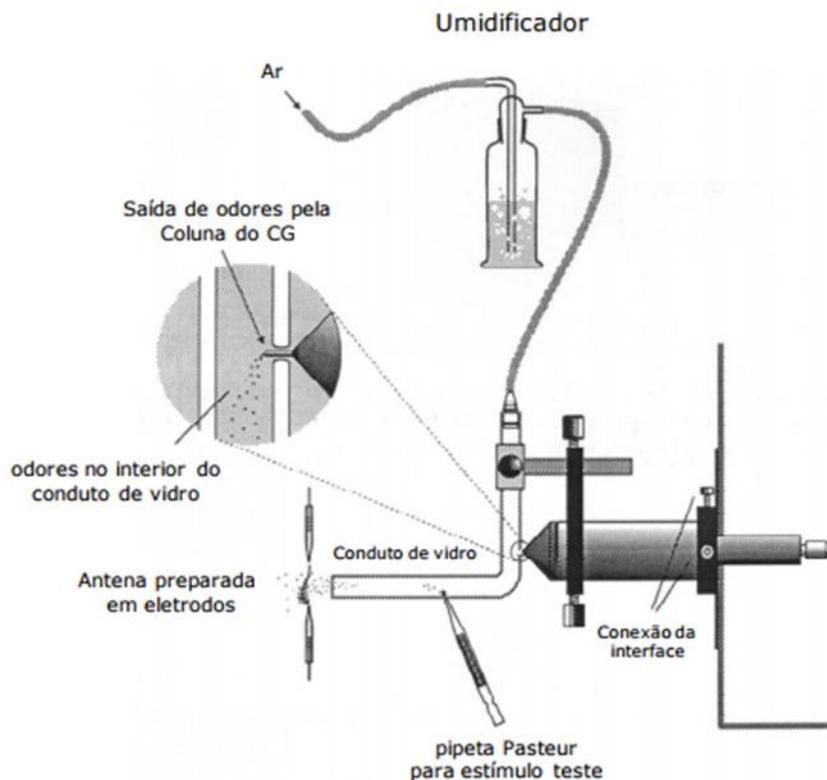


Figura 8: Detalhe ampliado da interface do sistema de CG-EAD (Syntech, 2015).



2.4 Bioensaios comportamentais com *Alphitobius diaperinus*

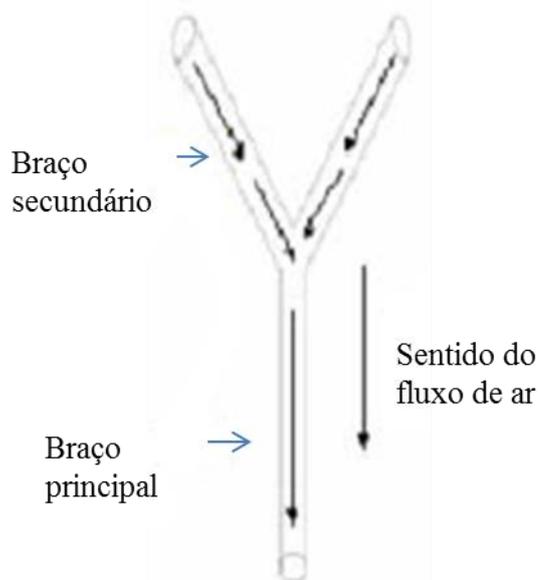
Bioensaios comportamentais são conduzidos com o objetivo de verificar e quantificar a resposta motora do inseto ao perfil volátil de plantas, de outros insetos, extratos ou padrões sintéticos (fonte de estímulo). Esses testes são fundamentais para a determinação da completa identidade de um semioquímico, ou seja, sua função ecológica e mecanismos comportamentais dos insetos mediante a apresentação do estímulo (EIRAS; MAFRA-NETO, 2001).

Em geral, utilizam-se aparatos que se adequam ao tamanho e características biológicas da espécie de interesse. Os mais comuns são olfatômetros ou arenas, para insetos caminhadores, e túneis de vento, para insetos voadores, para onde os voláteis são carregados por uma corrente de ar, formando uma pluma de odor. Insetos caminhadores como os coleópteros são guiados por quimiotaxia, orientação em resposta a mudanças na concentração do odor, e anemotaxia, orientação guiada pela direção do vento, para localizar parceiros para o acasalamento e recursos (MORAES et al., 2003).

Estudos comportamentais anteriores com *Alphitobius diaperinus* incluíram bioensaios em olfatômetros de dupla escolha (Y), múltipla escolha e Túnel de vento (figuras 9 e 10). Singh e Johnson (2012), utilizando um bioensaio de dupla escolha para testar a atividade dos componentes do feromônio de agregação do *A. diaperinus*, (R)-(+)-limoneno, (E)- β -ocimeno, (S)-(+)-linalool, (R)-(+)-dauceno, and 2-nonanona, mostraram que dos cinco compostos emitidos pelos machos *A. diaperinus*, que foram isolados, apenas (E)- β -ocimeno, (R)-(+)-dauceno e 2-nonanona desmonstraram atividade comportamental. No entanto, este estudo não investigou diferentes combinações da mistura dos cinco componentes emitidos.

Hassemer et al. (2016) testaram seis componentes do feromônio de agregação emitidos por machos de *A. diaperinus*, através de bioensaios de comportamento com olfatômetro do tipo em Y. Em um braço foi colocado à amostra ou estímulo (composto sintético) e no outro braço foi colocado o controle. Os compostos foram testados em forma de mistura em três concentrações. Nesse tipo de bioensaio, os insetos são analisados individualmente e foram aclimatados por 30 minutos antes do início dos bioensaios para melhor adaptação dos mesmos ao ambiente.

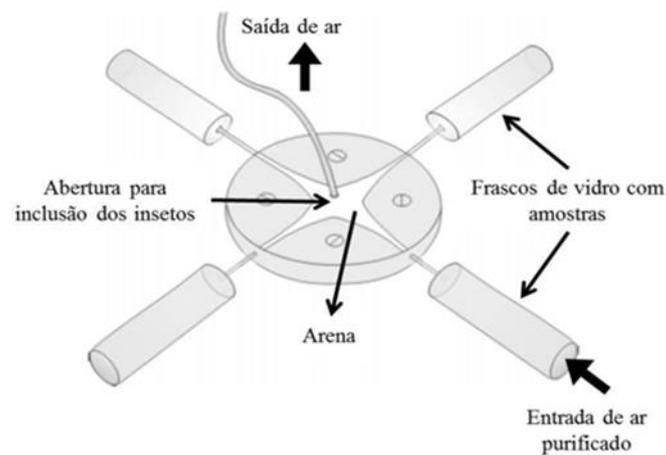
Figura 9: Olfatômetro de dupla escolha (Y).



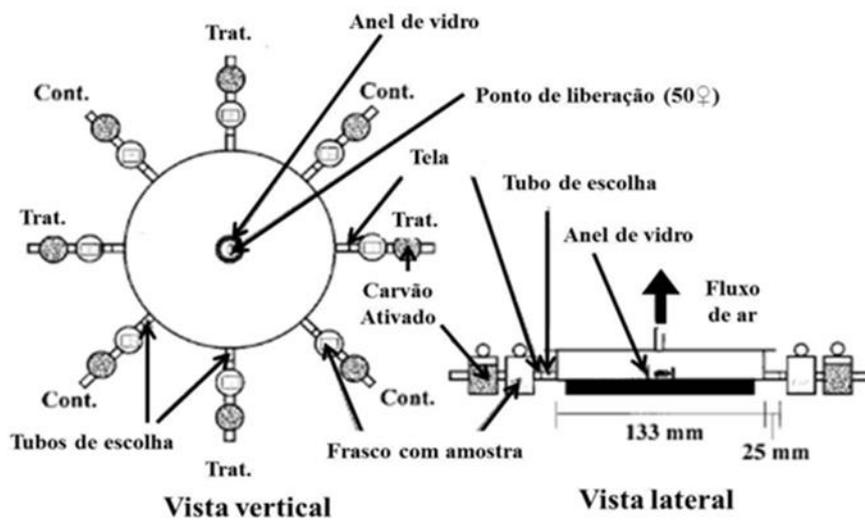
Os olfatômetro de múltipla escolha fornece uma zona central neutra, circundada por 4 regiões bem específicas de odor, nas quais os insetos podem entrar, experimentar o odor e então decidir se permanece ou se vai para outra área do aparato. Os insetos podem ser testados individualmente ou em grupo e as respostas comportamentais podem ser monitoradas diretamente pelo observador ou por câmeras de vídeo, com auxílio, inclusive de softwares

específicos de registro de posição. Parâmetros que podem ser avaliados incluem o número de entradas e tempo de permanência em cada braço, a primeira e última escolha do inseto. O olfatômetro de 4 braços tem sido muito utilizado para verificar a resposta de insetos pequenos, como himenópteros parasitoides, afídeos e coleópteros a uma vasta gama de odores (CEBALLOS et al., 2015; MENDESIL et al., 2009; POPE et al., 2012; UKEH et al., 2010).

Figura 10: Olfatômetro de múltipla escolha



A. Olfatômetro com 4 Braços



B. Olfatômetro com 8 Braços

REFERÊNCIAS

AGELOPOULOS, N. G.; HOOPER, A. M.; MANIAR, S. P.; PICKETT, J. A.; WADHAMS, L. J. A novel approach for isolation of volatile chemicals released by individual leaves of a plant in situ. *Journal of Chemical Ecology*, v. 25, p. 1411-1425, 1999.

AGUILLERA, MM et al. (2001) Controle biológico de *Diloboderus abderus* (Coleoptera: Melolonthidae): estudos preliminares com nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Steinernematidae e Heterorhabditidae). In: REUNIÃO SULBRASILEIRA DE PRAGAS DO SOLO, 8. Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja. Doc.172, p.202-207. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/CNPSO/18351/1/doc172.pdf>>.

ALVES, L. F. A. *et al.* Ação Da Terra De Diatomácea Contra Adultos Do Cascudinho. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 73, n. 1, p. 115–118, 2006.

ALVES, L. F. A. *et al.* Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em adultos de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) em aviários comerciais em Cascavel, PR. *Neotropical Entomology*, v. 33, n. 6, p. 793–795, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2004000600018&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

ALVES, L. F. A.; OLIVEIRA, D. G. P.; NEVES, P. M. O. J. Fatores que afetam a eficiência da Terra de Diatomácea no controle de adultos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, v. 37, n. 6, p. 716–722, dez. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2008000600014&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 6 set. 2016.

ALVES, L. F. A.; ROHDE, C.; ALVES, V. S. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, v. 34, n. 1, p. 139–141, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2005000100022&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

AMBROGI, B. G. *et al.* Feromônios de agregação em curculionidae (insecta: Coleoptera) e sua implicação taxonômica. *Química Nova*, v. 32, n. 8, p. 2151–2158, 2009.

AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S.; Cromatografia: Princípios Básicos e Técnicas Afins. Editora Interciência, 2003.

AQUINO NETO, F. R.; Uma Abordagem Simples e Abrangente para Dominar as Variáveis que Afetam a Injeção em Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. *Scientia Chromatographica*, v. 2, n. 4, p. 51-67, 2010.

BACHROUCH, O. *et al.* Fumigant toxicity of Pistacia lentiscus essential oil against Tribolium castaneum and Lasioderma serricorne. *Bulletin of Insectology*, v. 63, n. 1, p. 129–135, 2010.

BALA, M.; SHARMA, A. Review of some recente techniques of age determination of blow flies having forensic implications. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, v. 6, p. 203-208, 2016.

BARTELT RJ, ZILKOWSKI BW, COSSÉ AA, STEELMAN CD, SINGH N (2009) Male-produced aggregation pheromone of the lesser mealworm beetle, *Alphitobius diaperinus*. *J ChemEcol* 35:422–434. doi: 10.1007/s10886-009-9611-y

BENDERA, M.; EKESI, S.; NDUNG’U, M.; SRINIVASAN, R.; TORTO, B. A major host plant volatile, 1-octen-3-ol, contributes to mating in the legume pod borer, Maruca vitrata (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). *The Science of Nature*, v. 102, n. 7, p.1-10, 2015.

BICHO, C. DE L. *et al.* Flutuação populacional circanual de coleópteros em granja avícola, em Pelotas, RS, Brasil. *Iheringia. Série Zoologia*, v. 95, n. 2, p. 205–212, 30 jun. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-47212005000200011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 6 set. 2016.

BICCHI, C.; CAGLIERO, C.; RUBIOLO, P. New trends in the analysis of the volatile fraction of matrices of vegetable origin: a short overview. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 26, p. 321–325, 2011.

CAMARGO NETO, A. *et al.* Seasonal variation of Alphitobius diaperinus population in broiler facilities in the center-north region of the state of São Paulo. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. 8, n. 3, p. 183–185, set. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2006000300008&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 6 set. 2016.

CEBALLOS, R.; FERNANDÉZ, N.; ZÚÑIGA, S.; ZAPATA, N. Electrophysiological and behavioral responses of pea weevil *Bruchus pisorum* L. (Coleoptera: Bruchidae) to volatiles collected from its host *Pisum sativum* L. *Chilean Journal of Agricultural Research*, v. 75, n.2, p. 202-209, 2015.

CHERNAKI-LEFFER, A.M.; ALMEIDA, L.M. (2001) Exigências térmicas, período de desenvolvimento e sobrevivência de imaturos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.3, p.365-368. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2001000300004>

CHERNAKI-LEFFER, A. *et al.* Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. 4, n. 3, p. 243–247, dez. 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2002000300009&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 6 set. 2016.

CHERNAKI-LEFFER, A. M. *et al.* Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera, Tenebrionidae) to cypermethrin, dichlorvos and triflumuron in southern Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 55, n. 1, p. 125–128, 2011a. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0085-56262011000100020&lng=en&nrm=iso&tlng=en%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262011000100020.

CHERNAKI-LEFFER, A. M. *et al.* Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera, Tenebrionidae) to cypermethrin, dichlorvos and triflumuron in southern Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 55, n. 1, p. 125–128, mar. 2011b. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0085-56262011000100020&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 6 set. 2016.

CHERNAKI, A. M.; ALMEIDA, L. M. DE. Exigências Térmicas, Período de Desenvolvimento e Sobrevivência de Imaturos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, v. 30, n. 3, p. 365–368, set. 2001. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2001000300004&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 6 set. 2016.

CHERNAKI, A.M (2004) **Dinâmica populacional, estimativa da resistência a inseticidas e suscetibilidade do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera:**

Tenebrionidae) a inseticidas reguladores de crescimento e a fungos entomopatogênicos.

Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 62 p.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P. S.; Fundamentos de Cromatografia. Editora da UNICAMP, Edição 1, 2006.

COSSÉ, A. A.; TODD, J. L.; MILLAR, J. G.; MARTINÉZ, L. A.; BAKER, T. C.

Electroantennographic and coupled gas chromatographic-electroantennographic responses of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, to male-produced volatiles and mango odor.

Journal of Chemical Ecology, v. 21, n. 11, 1995.

COX PD (2004) Potential for using semiochemicals to protect stored products from insect infestation. *J Stored Prod Res* 40:1–25. doi: 10.1016/S0022-474X(02)00078-4

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

DAVILA, M. (BAYER DE M. S. A. DE C. V. D. S. A. A. .; REBOLLO, M.; TELLEZ, G. [The importance of the beetle *Alphitobius diaperinus* in poultry litter as a vector of *Salmonella* sp. and *Escherichia coli* in poultry farms in Mexico]. *Western Poultry Disease Conference (USA)*, 1996. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?jsessionid=4992BCEA9AD8F55A0AE38648725C7ACC?request_locale=es&recordID=US9740248&sourceQuery=&query=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=¢erString=&enableField=#.V89OhHJTCKE.mendeley>. Acesso em: 6 set. 2016.

DESPINS, J. L. *et al.* EVALUATION OF METHODS TO PROTECT POULTRY HOUSE (COLEOPTERA : TENEBRIONIDAE) 1 . 2 Insecticide Residual Experiment in the Laboratory. *J. Agric. Entomol*, v. 8, n. 3, 1991.

EBELING, W. Sorptive dusts for pest control. *Annual review of entomology*, v. 16, n. 117, p. 123–58, 1971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4324088>>.

ENNIGROU, A. *et al.* Maturation-related changes in phytochemicals and biological activities of the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruits. *South African Journal of Botany*, v. 108, p. 407–415, 2017.

EIRAS, A. E.; MAFRA-NETO, A. Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento de insetos. In: VILELA, E.F.; DELLA-LUCIA, T. M.C. (Eds). Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas. 2 ed. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001. p. 27-39.

FERREIRA, ECB (2011) **Uso de nim no controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera Tenebrionidae) em vagens de amendoim armazenado.** Trabalho de conclusão de graduação. Universidade Estadual da Paraíba.

GARCÍA-VILLALBA, R.; PACCHIAROTTA, T.; CARRASCO-PANCORBO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; DEELDER, A.M.; MAYBORODA, O.A. Gas chromatography –atmospheric pressure chemical ionization time of flight mass spectrometry for profiling of phenolic compounds in extra virgin olive oil. **Journal of Chromatography A**, v.1218, n.7, p.959-971, 2011

HAMM PB, HY CW, HUTCHINSON PJ, STEVENSON WR, BOYDSTON RA, ALVAREZ JM, ALYOKIN A, DIVELY G, GUDMESTAD NC, AND KIRK WW. Managing pesticide resistance. In Potato Health Management. Plant Health Management Series (Ed. D.A. Johnson). American Phytopathological Society, St Paul, MN, USA. Second Edition. p. 123-131, 2008.

HASSEMER, M. J. *et al.* Revisiting the Male-Produced Aggregation Pheromone of the Lesser Mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera, Tenebrionidae): Identification of a Six-Component Pheromone from a Brazilian Population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 64, n. 36, p. 6809–6818, 2016.

HILBERT, F. *et al.* Salmonella in the wildlife-human interface. *Food Research International*, v. 45, n. 2, p. 603–608, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.015>>.

HOELZER, K.; SWITT, A. I. M.; WIEDMANN, M. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Veterinary Research*, v. 42, n. 1, p. 1–27, 2011.

JAPP, A. K.; BICHO, C. DE L.; SILVA, A. V. F. DA. Importância e medidas de controle para *Alphitobius diaperinus* em aviários. *Ciência Rural*, v. 40, n. 7, p. 1668–1673, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782010000700030&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>.

JIANG, Z. L. *et al.* Insecticidal and feeding deterrent activities of essential oils in the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*, v. 136, n. 3,

p. 191–202, 18 abr. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0418.2010.01587.x>>. Acesso em: 6 set. 2016.

JIN, M. *et al.* Dual enantioselective effect of the insecticide bifenthrin on locomotor behavior and development in embryonic-larval zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 29, n. 7, p. 1561–1567, 2010.

KORUNIC, Z. Diatomaceous earths, a group of natural insecticides. *Journal of Stored Products Research*, v. 34, n. 2–3, p. 87–97, 1998.

KREMSER, A.; JOCHMANN, M. A.; SCHMIDT, T. C. Systematic comparison of static and dynamics headspace sampling techniques for gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 408, p. 6567-6579, 2016.

LAW, J. H.; REGNIER, F. E. Pheromones john h. law and fred e. regnier. *Perception*, 1971.

LEFFER, A. M. *et al.* Vectorial competence of larvae and adults of *Alphitobius diaperinus* in the transmission of salmonella enteritidis in poultry. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 10, n. 5, p. 481–487, 2010.

LIKHAYO, P. W.; HODGES, R. J. Field monitoring *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) using refuge and flight traps baited with synthetic pheromone and cracked wheat. *Journal of Stored Products Research*, v. 36, p. 341-353, 2000.

MCLAFFERTY, F. W.; SENKO, M. W. Mass spectrometry in the development of drugs from traditional medicines. *Stem Cells*, v. 12, n. 1, p. 68-73, 1994.

MARCOMINI AM, ALVES LFA, NOGUEIRA MA *et al.* (2005) Preliminary evaluation of plant extracts for the control of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera; Tenebrionidae). UNICENTRO XIV EAIC -Annual Meeting of Scientific Initiation – Guarapuava, PR, Brazil.

MARQUES, C. R. G. *et al.* Mortalidade de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) por óleos de nim e citronela. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 6, p. 2565–2574, 2013.

MATSUO, A. L. *et al.* α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 411, n. 2, p. 449–454, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.176>>.

MENDESIL, E.; BRUCE, T. J. A.; WOODCOCK, C. M.; CAULFIELD, J. C.; SEYOUM, E.; PICKETT, J. A. Semicemicals used in host location by the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 35, p. 944-950, 2009.

MICHEREFF, M. F. F. *et al.* Volatiles Mediating a Plant-Herbivore-Natural Enemy Interaction in Resistant and Susceptible Soybean Cultivars. *Journal of Chemical Ecology*, v. 37, n. 3, p. 273–285, 2011.

MORI, K. Chemical ecology. In: **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. Elsevier, 2013. 2p.

NYASEMBE, V. O.; TEAL, P. E. A.; MUKABANA, W. R.; TUMLINSON, J. H.; TORTO, B. Behavioral response of the malaria vector *Anopheles gambiae* to host plant volatiles and synthetic blends. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 234, 2012.

OLSSON, S. B.; HANSSON, B. S. Electroantennogram and single sensillum recording in insect antennae. *Methods in Molecular Biology*, v. 1068, p. 157-177, 2013.

OLTON, G. S. Worldwide Survey and Comparison of Adult β -TM Predator and Scavenger Insect Populations Associated with Domestic Animal Manure Where Livestock Is Artificially Congregated. v. 40, n. 9, 1970.

OMAR, J.; OLIVARES, M.; ALONSO, I.; VALLEJO, A.; AIZPURUA-OLAIZOLA, O.; ETXEBARRIA, N. Quantitative Analysis of bioactive compounds from aromatic plants by means of dynamic headspace extraction and multiple headspace extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Food Science*, v. 81, n. 4, 2016.

OU, S. C.; GIAMBRONE, J. J.; MACKLIN, K. S. Detection of infectious laryngotracheitis virus from darkling beetles and their immature stage (lesser mealworms) by quantitative polymerase chain reaction and virus isolation. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 21, n. 1, p. 33–38, 2012.

PAIVA, MR, PEDROSA-MACEDO, JHP (1985) *Feromonas de Insetos*. Curitiba: GTZ, 94 p.

PENTEADO, J. C. P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J. C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2190-2193, 2008.

PEREIRA RM, ALVES SB, REIS PR. Segurança no emprego de entomopatogênicos, 1998. p. 171-191. In S.B. Alves (ed), Controle microbiano de insetos . Piracicaba, Fealq, 2 ed.,p.171-193.

PEREIRA, A. S.; AQUINO NETO, F. R.; Estado da arte da Cromatografia Gasosa de Alta Resolução e Alta temperatura, *Química nova*, v. 23, n. 3, 2000.

PEREIRA, P. R. V. S.; ALMEIDA, L.M. Chaves para identificação dos principais Coleoptera (Insecta) associados com produtos armazenados. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 18, n. 1, p. 271-283, 2001

PICANÇO, M. *Manejo Integrado De Pragas Na. .* [S.l: s.n.]. , 2010

PINTO, D. M.; RIBEIRO, P. B.; BERNARDI, E. Avaliação De Métodos Para Monitorar Populações De Artrópodes Em Granja Avícola , Em Pelotas , Rio Grande Do Sul , Brasil. *Arq. Inst. Biol*, v. 74, n. 2, p. 95–99, 2007.

POPE, T. W.; GIRLING, R. D.; STALEY, J. T.; TRIGODET, B.; WRIGHT, D. J.; LEATHER, S. R.; VAN EMDEN, H. F.; POPPY, G. M. Effects of organic and conventional fertilizer treatments on host selection by the aphid parasitoid *Diaeretiella rapae*. *Journal of Applied Entomology*, v. 136, p. 445-455, 2012.

REZENDE, SRF (2009) **Fungos Entomopatogênicos no Controle do *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) como Estratégia de Biossegurança na Avicultura**. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Zootecnia. UFRRJ. Seropédica-RJ, 2009.

ROCHE, A. J. *et al.* Transmission of Salmonella to broilers by contaminated larval and adult lesser mealworms, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Poultry science*, v. 88, n. 1, p. 44–8, 1 jan. 2009. Disponível em: <<http://ps.oxfordjournals.org/content/88/1/44.full>>.

Acesso em: 8 set. 2016.

RODRIGUEIRO, T. *Efeitos de nematóides entomopatogênicos das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae em larvas e adultos de Alphitobius diaperinus (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)*. 2010. 388-395 f. 2010.

SALIN, C. *et al.* Spatial distribution of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) in the soil of a poultry house along a breeding cycle. *European Journal of Soil Biology*, v. 36, n. 2, p. 107–115, 2000.

SINGH, N.; JOHNSON, D. T. Attractiveness of an Aggregation Pheromone Lure and Chicken Droppings to Adults and Larvae of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 105, n. 6, p. 2196–2206, 2012.

SYNTECH. *Electroantennography: a practical introduction*. Kirchzarten: Syntech, 2015. 30p.

TREMATERA, P. Advances in the use of pheromones for stored-product protection. *J. Pest Sci.*, v. 84, p. 285-299, 2012.

SPILMAN, TI (1991) *Darkling beetles (Tenebrionidae, Coleoptera)*. Washington, D.C.: **United States Government Printing Office**.v.1, p. 310.

SKOV, M. N. *et al.* The Role of Litter Beetles as Potential Reservoir for *Salmonella enterica* and Thermophilic *Campylobacter* spp. Between Broiler Flocks. *Avian Diseases*, v. 48, n. 1, p. 9–18, 2004. Disponível em: <<http://www.aaapjournals.info/doi/abs/10.1637/5698>>.

STEFANAZZI, N.; STADLER, T.; FERRERO, A. Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Pest Management Science*, v. 67, n. 6, p. 639–646, 2011.

TREMATERA, P. Advances in the use of pheromones for stored-product protection. *Journal of Pest Science*, v. 85, n. 3, p. 285–299, 2012.

UBABEF . União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual 2012/2015**. São Paulo. Disponível: <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761>. Acesso em 20 junho. 2016.

UE (UNIÃO EUROPEIA). Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council: establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. Official Journal of the European Union. 24 nov. 2009. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0071:0086:en:PDF>>. Acesso em: 23 nov.2017.

UKEH, D. A.; BIRKETT, M. A.; BRUCE, T. J. A.; ALLAN, E. J.; PICKETT, J. A.; MORDUE (LUNTZ), A. J. M. Behavioural responses of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*, to host (stored-grain) and non-host plant volatiles. *Pest Management Science*, v. 66, p. 44-50, 2010.

WEBSTER, B.; BRUCE, T.; DUFOUR, S.; BIRKEMEYER, C.; BIRKETT, M.; HARDIE, J.; PICKETT, J. Identification of volatile compounds used in host location by the black bean aphid, *Aphis fabae*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 34, p. 1153–1161, 2008.

WU, Y. *et al.* Contact toxicity and repellency of the essential oil of *Liriope muscari* (Decn.) bailey against three insect tobacco storage pests. *Molecules*, v. 20, n. 1, p. 1676–1685, 2015.

XUE, Z.; DUAN, L. X.; QI, X. Gas chromatography mass spectrometry coupling techniques. In: QI, X.; CHEN, X.; WANG, Y. (Eds). **Plant Metabolomics: methods and applications**. Dordrecht: Springer, 2015. p. 25-44.

YANG, K. *et al.* Bioactivity of essential oil of *Litsea cubeba* from China and its main compounds against two stored product insects. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, v. 17, n. 3, p. 459–466, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2014.03.011>>.

YANG, K. *et al.* Contact toxicity and repellency of the essential oil of *dictamnus dasycarpus* roots from China against two stored-product insects. *Chemistry and Biodiversity*, v. 12, n. 6, p. 980–986, 2015.

YANG, S. Z.; LIU, H. X.; YANG, M. H.; ZHANG, J. T.; LI, Z. W.; JING, X. Y.; ZHENG, H. X. Female sex pheromone of a nettle caterpillar, *Monema flavescens*, in China. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 161, p. 161-167, 2016.

YASUI, H. *et al.* Sesquiterpene hydrocarbons: Kairomones with a releaser effect in the sexual communication of the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae). *Chemoecology*, v. 18, n. 4, p. 233–242, 2008.

ZARBIN, P. H. G. Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos. In: VILELA, E.F.; DELLA-LUCIA, T. M.C. (Eds). Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas. 2 ed. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001. p. 45-50.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. Química Nova, v. 32, n. 6, p. 722-731, 2009.

CAPÍTULO I. CONTROLE DO CASCUDINHO (*Alphitobius diaperinus*, Coleóptera, Tenebrionidae) NA AVICULTURA: UMA REVISÃO.

Artigo de revisão submetido à revista Journal of Animal Science and Biotechnology, ISSN: 2049-1891, Qualis B1 na área Biotecnologia

Journal of Animal Science and Biotechnology
Control of the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*, Coleóptera, Tenebrionidae) in
aviculture: a review.

Manuscript Number:	
Full Title:	Control of the lesser mealworm (<i>Alphitobius diaperinus</i> , Coleóptera, Tenebrionidae) in aviculture: a review.
Article Type:	Review
Funding Information:	
Abstract:	<i>Alphitobius diaperinus</i> (Coleoptera: Tenebrionidae) is a cosmopolitan insect commonly known as the lesser mealworm, and originated in Africa. It is a secondary grain pest that attacks a wide range of stored agricultural products. This pest was introduced through livestock production, most probably through contaminated food. It spread rapidly and adapted well to avian cultures, making it a primary poultry pest. Due to their ability to carry pathogens they have a direct and indirect effect on poultry. A wide range of control methods are applied and used against this pest, primarily chemical products including pyrethroids and organophosphates. Due to the risk of chemical residue on poultry products and environmental risks there is a high market demand for the development of sustainable control methods. This review includes the biological cycle of <i>Alphitobius diaperinus</i> , the various available control methods and how future methods could improve. The main aspects to be covered are: the lack of knowledge regarding the ecology of <i>Alphitobius diaperinus</i> in the field and its behaviour towards the different large scale control treatments; the impact and effects of this pest; simple and accurate techniques used to assess insect population density in poultry sheds and stored products, taking into consideration poultry management. Strategies and alternative control methods against <i>Alphitobius diaperinus</i> will also be reviewed, including the rational use of pesticides, and the development and improvement of rapid and efficient monitoring devices. The development of integrated management tools including push-pull, and innovative techniques such as symbiotic microorganisms and the use of biomarkers will also be discussed.
Corresponding Author:	Janeilda Costa Vaz, M.D Universidade Federal de Alagoas Instituto de Química e Biotecnologia Maceió, BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Alagoas Instituto de Química e Biotecnologia
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Janeilda Costa Vaz, M.D
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Janeilda Costa Vaz, M.D Ana Paula Oliveira da Silva Adalberto de Souza Arruda Henrique Fonseca Goulart Alessandro Riffel Antônio Euzébio Goulart Santana
Order of Authors Secondary Information:	
Opposed Reviewers:	

Control of the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*, Coleoptera, Tenebrionidae) in aviculture: a review.

Janeilda Costa Vaz^{1,2*}, Ana Paula Oliveira da Silva¹, Adalberto de Souza Arruda², Henrique Fonseca Goulart³, Alessandro Riffel⁴ and Antônio Euzébio Goulart Santana³

* Correspondence to: Janeilda Costa Vaz, Federal University of Alagoas (UFAL), Chemistry and Biotechnology Institute, Av. Lourival Melo Mota, s/n, postcode 57072-900, Maceió, Alagoas State, Brazil. E-mail: janeilda@hotmail.com

¹ Federal University of Alagoas, Chemistry and Biotechnology Institute, Maceió – AL, Brasil

² Federal Institute of Education, Science and Technology of Pernambuco, Campus of Barreiros, Fazenda 16 Sapé, s/n, Zona Rural, Barreiros, Pernambuco, Brazil.

³ Laboratory of Natural Products Research, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Alagoas, Lourival Melo Mota Avenue, s/n, Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins, 57072-970, Maceió, Alagoas, Brazil.

⁴ EMBRAPA Tabuleiros Costeiros, BR 104, s/n, 57100-000, Rio Largo, Alagoas, Brazil

CONTROL OF THE LESSER MEALWORM (*Alphitobius diaperinus*, Coleoptera, Tenebrionidae) IN AVICULTURE: A REVIEW.

Janeilda Costa Vaz^{1*}, Ana Paula Oliveira da Silva², Adalberto de Souza Arruda¹, Henrique Fonseca Goulart², Alessandro Riffel³ and Antônio Euzébio Goulart Santana²

Abstract

Alphitobius diaperinus (Coleoptera: Tenebrionidae) is a cosmopolitan insect commonly known as the lesser mealworm, and originated in Africa. It is a secondary grain pest that attacks a wide range of stored agricultural products. This pest was introduced through livestock production, most probably through contaminated food. It spread rapidly and adapted well to avian cultures, making it a primary poultry pest. Due to their ability to carry pathogens they have a direct and indirect effect on poultry. A wide range of control methods are applied and used against this pest, primarily chemical products including pyrethroids and organophosphates. Due to the risk of chemical residue on poultry products and environmental risks there is a high market demand for the development of sustainable control methods. This review includes the biological cycle of *Alphitobius diaperinus*, the various available control methods and how future methods could improve. The main aspects to be covered are: the lack of knowledge regarding the ecology of *Alphitobius diaperinus* in the field and its behaviour towards the different large scale control treatments; the impact and effects of this pest; simple and accurate techniques used to assess insect population density in poultry sheds and stored products, taking into consideration poultry management. Strategies and alternative control methods against *Alphitobius diaperinus* will also be reviewed, including the rational use of pesticides, and the development and improvement of rapid and efficient monitoring devices. The development of integrated management tools including push-pull, and innovative techniques such as symbiotic microorganisms and the use of biomarkers will also be discussed.

Keywords: Coleoptera, kairomone, stored products.

Background

Poultry farming is considered an internationalised and uniform economic activity without geographic limits. It is also considered to be a complex industry that should not be analysed based on production and distribution, but rather through a systematic approach that includes the productive chain.

The efficiency of this chain is related to several factors such as: improvement of poultry breeding, inputs, automation of the productive system, sanitation control at breeding sites, personal improvement when handling the poultry, in addition to the integrated production system which consists of joint efforts by small producers and large poultry enterprises [1, 2]. Aviculture also has a social significance as it is responsible for the direct and indirect employment of millions of people, generating income in the field [3, 4].

Over the last three decades, poultry farming has increased significantly, standing out within the international meat market. Brazil has been the main poultry exporting country since 2015 [5], and according to the Brazilian Aviculture Union, in 2015, Brazil took second place world-wide in poultry production [6]. It is estimated that in 2018/2019 Brazilian poultry exports should account for 90% of world poultry trade [2].

The increase in poultry production driven by the high demand in the market requires an increase in confinement breeding which results in increased chicken density within sheds; this also involves more batches on the same bedding, with less space between the batches. These factors all contribute to the multiplication of pathogenic microorganisms and the increase in pest populations, including *Alphitobius diaperinus*.

A. diaperinus is related to numerous problems that interfere affect the performance of broiler chickens, such as decreased feeding and increased disease transmission which eventually bring about in financial losses [7, 8]. This pest is found in poultry confinements as it provides an optimal breeding site, thus making it difficult to control [9, 10, 11, 12].

The primary control method against *A. diaperinus* is based on insecticides regardless of their side effects on poultry, humans and the environment. Alternative techniques include

physical control, biological control, and the implementation of integrated pest management aiming to combine the different tools in order to eliminate the pest in a safe, efficient and sustainable manner [13, 14].

This review involves the ecology of *A. diaperinus*, identifying topics that still need further investigation in order to better understand the factors that influence the development of these insects, such as their life cycle. The various control methods used against this pest will also be addressed, including the potential use of the techniques in integrated management. In order to conclude this review, we look at different perspectives for future work with the objective to control this pest in an efficient and sustainable matter.

Alphitobius diaperinus

Alphitobius diaperinus (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) is a cosmopolitan species, that originated in Africa. It presents the following taxonomic classification:

Kingdom Animalia

Phylum: Arthropoda

Class: Insecta

Order: Coleoptera

Suborder: Polyphaga

Family: Tenebrionidae

Subfamily: Tenebrioninae

Genus: *Alphitobius* Stephens, 1832

Species: *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797)

The molecular study of *Alphitobius diaperinus* was described in Germany and France and the data are deposited in the BOLD (The DNA Barcode of Life Data System) BOLD: ACZ1026. It is considered a secondary pest of stored grain and cereals. According to Spilman

[15] and Ferreira [16], this insect attacks flour and grain, particularly stored products such as soy, nuts, and beans among others.

The lesser mealworm may have been introduced into livestock production through contaminated food, meaning it could spread quickly and adapt to avian cultures, thereby becoming one of the main poultry pests worldwide [17, 18, 19, 20].

In this way, this insect has become the primary pest that affects different kinds of poultry production systems. Once this pest gets established, it soon multiplies and can be found in high densities in litter of broiler chickens, in broodhens, and even in faeces of commercial laying hens confined in cages. The conditions of aviaries, factors such as temperature, humidity, ventilation, water and appropriate food, favour the development and establishment of the lesser mealworm.

Impact and cutting effects of *Alphitobius diaperinus*

This pest is considered be difficult to control because of its behavioural and biological characteristics that allow its proliferation, in addition to being a vector and carrier of pathogenic agents that lead to great economic losses and sanitation defects in aviculture. Amongst the different pathogens transmitted by the lesser mealworm are high-risk bacteria, viruses, fungi, protozoans, and parasites that are causative agents of diseases such as avian pox. This virus attacks the epithelial tissue causing lesions and wart-like growths. Newcastle disease is caused by a virus that belongs to the Avulavirus genus which has a global economic impact due to its high virulence that results in high avian mortality rates. *Aspergillus* spp. is a fungus that produces toxins such as aflatoxin B₁ considered both a toxin and a carcinogen, causing serious health problems in poultry, eventually leading to death [12, 21, 22, 23, 24].

Larval and adult stages of *A. diaperinus* harbour viable pathogens both on their surface and in the digestive tract [25]. The adults can transmit the following bacteria: *Campylobacter*

spp. [26], *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. amongst others that can cause weight loss and even death [22, 24, 27, 28, 29].

Infestation by *A. diaperinus* in aviaries causes health risks to poultry, and also to humans, as they contribute to the contamination of commercial products. Salmonella is a disease that derived from bacterial infestation of chickens caused by *Salmonella enterica*, which can cause enteritis, and inflammation of the intestinal mucosa in humans through ingestion of contaminated meat. Symptoms involve vomiting, fever, diarrhoea, and abdominal pains. Several studies have been developed aiming at the biosafety of products of animal origin and the biosafety of plants (22, 24, 30, 31).

There are other harmful effects that the insect has on poultry, effects related to performance, such as the habit of eating moving objects which brings about replacement a balanced diet by a diet of larvae and adult coleopterans which mainly affects the performance of young poultry [20, 32]. This behaviour also favours secondary infections which interfere with the quality of the meat through contamination of the carcasses during processing in the slaughterhouse. This occurs because the larvae and adults perforate the skin of the poultry to obtain blood exudates [32, 33].

The impact of this pest on animal welfare is important, as the expression of the natural behaviour and level of comfort in poultry breeding environment is affected by *A. diaperinus* infestations. The stress caused by infestation reduces zootechnical indices such as daily weight gain reduction, reduction of slaughter weight, all of which results in increased mortality rate and increase in the feed conversion rate, which lead to great economic losses in poultry production. These indices are altered depending on the nutritional imbalance cause by ingestion of adults [34].

Economic importance

Pests are a major concern to producers worldwide due to their financial impact. *Alphitobius diaperinus* is of significant importance when raising poultry due to the breeding

system: the floor of breeding sites is covered with sawdust also known as “bedding” (a substrate of grain straws, sugarcane bagasse or sawmills) used to accommodate the chickens, however, when mixed with faeces, surplus water and food it creates a perfect breeding ground for the insects [35, 36].

The lesser mealworm can influence the development and hygiene of poultry. Its importance stems from the damaging effects on the poultry production chain: on hygiene, through the transmission of pathogens and susceptibility to infection; on productivity, through weight reduction and impairment of feed conversion; on structure, through deterioration of installations; on quality, through depreciation of carcasses and organ losses; ethologically, through the effects on animal welfare; and, last but not least, environmental, through the use of pesticides that also affect workers as occupational diseases may occur. Direct contact between the insect and the bedding in the aviaries, such as their habit to feed on sick and dying poultry, make the insect a carrier of various pathogens, hence increasing production costs and losses in poultry-farming activity [22, 26, 30, 32].

Another relevant issue reported is that young poultry are able to ingest a large quantity of larvae, which causes nutritional imbalance, weight loss, and delayed development and growth. Chicks are able to ingest up to 450 larvae in their first 10 days of life [27]. In addition, ingesting adult insects which have a rigid exoskeleton and elytra can cause physical damage to the gastrointestinal tract leaving the poultry susceptible to infections [20, 29]. In relation to larvae, they can cause lesions on the skin of the poultry which favours secondary infections and decreases the quality of the meat [37].

Alphitobius diaperinus can also damage the shed installations. The larvae are able to dig tunnels in the structure of the shed and jeopardise the welfare of the animal; affect natural behaviour and influence the level of comfort; and also cause diseases in the animals, and also have an effect on human health such as allergies, hives, angioedema, asthma, and conjunctivitis [9,32, 34].

Biological cycle

The biological cycle of *A. diaperinus* can vary between 50 and 70 days, and is directly linked to temperature. They are holometabolous insects, meaning that they go through different stages: eggs, larvae, pupae, and adults (Figure 1). The larval stage is the phase that causes the widest economic damage since the larvae are able to damage the shed structure through excavation facilitating further infestations and making it difficult to control [29, 38].

Figure 1 Development stages of *Alphitobius diaperinus*

Egg

Alphitobius diaperinus eggs are generally laid in a group of twelve, they have a white milky colour and are commonly found in chicken “bedding”, shed cracks or between the slots of food in order to have access to nutrition and protection as they do not have sufficient chitin, which make them vulnerable [29, 38].

Initially, the egg has a spherical shape but after two days it acquires an elliptical shape (Figure 2) with a transparent and fragile chorion; the eggs also possess an adhesive substance that is used to stick to other eggs or substrates. The length varies between 1 and 1.17 mm and the width is between 0.5 to 0.7 mm. The incubation period is temperature dependent; the higher the temperature, the shorter the incubation period [29, 38].

Source: Author, 2017

Figure 2 *Alphitobius diaperinus* egg

Larvae

When the larvae hatch they are of a milky colour, until the third instar, when they take on a brownish colour. They sclerotise during their development and can reach 13.8 mm in

length at the final instar (Figure 3). The larvae go through 5 to 11 instars (5 – 11 days per instar) before they are fully developed [29].

The parameters used for determining the different larval stages is based on the width of the cephalic capsule, which can range from 0.20 mm (1st instar) to 1.35 mm (8th instar). The larvae can reach the eighth instar in temperatures from 28 °C to 30 °C, while at temperatures lower than 28 °C they can go through eleven instars [38].

Source: Author, 2017

Figure 3 Different instars of *Alphitobius diaperinus*

Pupae

Pupae can vary in length between 6.4 mm and 6.7 mm, they are white initially but darken as they develop. The shape of pupae is not unlike that of adults with outlined eyes and wings [29].

A darker pigment in the eyes can be observed in the final stages of development. The abdomen of the pupa has jagged lateral margins. The wings and elytra have numerous striae, and the antennae are protected by the prosternal groove (38, 39).

Sexual dimorphism can be observed through the proportional difference in the urogomphi and pygopods: females have a prominent urogomphus and a prominent pygopod, whilst males don't have any prominent structure or pygopods. Female pupae are generally longer (6.24 mm to 7.5 mm) and wider (2.25 to 2.5 mm) than male pupae; however, size is not a reliable sexual dimorphism. The posterior abdomen of female pupae has a distinct sexual dimorphism considered as genitalia, also known as pygopods (Figure 4) [29, 38, 39].

Source: Author, 2017

Figure 4 Sexual dimorphism in *Alphitobius diaperinus* pupae: A – male; B – female.

Adults

Adult insects have a brown/black colour and a length between 5.0 and 7.0 mm and width of 2.5 mm to 3.2 mm, eyes and longevity vary between three months to one year. The ideal temperature for development is 32 °C, with 15% humidity [29]. The morphology of adults shows spurs located at the apex of the tibia, the first set of wings are elytra that have finely impressed striae and the second set of wings are membranous with shallower venation, the three auxiliary sclerites are defined; the abdomen has five visible external sterna in both sexes. The female genital is composed of the eighth and ninth abdominal segments. In addition to these segments, there is an apodema that holds the entire genitalia. Females are able to produce more than two thousand eggs every 42 days at a constant temperature of 28 °C. The male genitalia is composed by the seventh, eighth, and ninth abdominal segments, beside the gastral spine; the male aedeagus is a sclerotised organ that houses an inner sac from which the ejaculatory duct leaves [38, 39].

When adults emerge they have a white coloration (Figure 5 A, annex) and only acquire chitin after four days, after which they take on the characteristic brownish colour (Figure 5 B, annex). Generally, reproduction occurs twenty days after emergence. These insects have nocturnal habits, hiding during the day within chicken bedding, and shed cracks. The ideal temperature for development is around 32 °C [38, 40].

Source: Author, 2017

Figure 5 *Alphitobius diaperinus* adults: A) newly emerged, without chitin; B) adults with chitinised exoskeleton.

Control methods against *Alphitobius diaperinus*

Control of the lesser mealworm is difficult as they have a relatively short life cycle and behaviour that favours re-infestation, as the lesser mealworms hide within bedding, below sheds, and wall cracks [29]. The use of semiochemicals as a control against pests is becoming a crucial tool, as these can be used for monitoring and to interrupt breeding of certain pests.

Physical control

Physical control consists of management and disinfection of aviaries. It is based on the use of fire, flooding and temperature regulation, as high temperatures facilitate control of the lesser mealworm. The interval between the lost and sanitation following periods are ideal for the control of this species in the aviaries because the temperature can be raised above 45 °C with closed blinds in order to affect the lesser mealworm population. In addition, frequent removal of bedding after removing the animals and increased hygiene are other courses of action through which the number of insects can be reduced [10].

According to Berchieri Junior *et al.*, [41] it is difficult to use temperature to interfere with the life cycle of these insects as the temperature maintained in aviaries is between 21 to 31 °C which favours their development. High temperatures are obtained through heaping of the bed, humidification and the use of plastic tarpaulins for fermentation to take place [33]. In regions with milder climate, cold control can be performed which affects the life cycle of the lesser mealworm, this is conducted through handling of blinds and through a sudden drop of temperature below 15 °C [25].

Gazoni *et al.*, [42], subjected the insects to various temperatures (-18 °C, -13 °C, -10 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, and 60 °C) in acclimatised chambers through visual monitoring to assess mortality rate (TL100). The conclusion reached was that temperatures below -10 °C and above 45 °C causes both larval and adult mortality, in the presence and absence of shavings.

Physical factors such as humidity (water vapour present in the bedding), and temperature can vary between 28 and 33 °C inside poultry houses and it has been shown that the addition of calcium hydroxide results in acceleration of the biological cycle [33]. Physical control is an alternative that can be used together with other control methods in order to have a greater effect on *A. diaperinus* mortality.

Alternative natural control methods related to physical control

Diatomaceous earth (TD) is a powder made from naturally occurring earth that consist of fossilised remains of hard-shelled algae. It is used as a pesticide due to its ability to absorb lipids from insects' exoskeletons, causing them to dehydrate [43, 44]. This product has been studied as an alternative method to control *A. diaperinus*. Studies have shown that diatomaceous earth provides satisfactory results in controlling coleopteran pests in stored grains, including *Prostephanus truncates* (Bostrichidae), *Sitophilus zeamais* (Curculionidae), *Callosobruchus maculatus* and *Acanthoscelides obtectus* (Chrysomelidae) [45].

One study conducted by Alves *et al.*, [46] under laboratory conditions, evaluated the efficiency of diatomaceous earth as a control method to use against the lesser mealworm, in two stages. In the first stage, adult insects were exposed to 1, 2 and 3 g of diatomaceous earth which was mixed with 1 kg of food at 26 and 32 °C. The authors determined the insecticide's effect, at the three different concentrations, as follows: 70, 83.3 and 90 % mortality, respectively.

Viana [47] tested the effect of diatomaceous earth in a field study in two aviaries, one was treated with pyrethroids and other with diatomaceous earth. Results were compared and showed that diatomaceous earth have a similar efficiency to the pyrethroid used, as a control method against *A. diaperinus* adults and larvae.

Chemical control

As insecticides have increased productivity in agriculture and livestock against pests, insecticide is considered an important and indispensable tool, as insect pests are responsible for losses during food production. Most chemical control methods are based on the use of chemical insecticides with a short residual period, thus its utilisation causes a temporary and limited reduction due to the constant presence of poultry. In general, insecticides show certain problems, such as resistant insect population, intoxication of humans, and also environmental and poultry contamination which becomes an obstacle for meat exportation as the European Union does not allow the use of certain chemical products as methods of control, method including organochlorides and neonicotinoid pesticides [9, 12, 48, 49].

Chemical insecticides that are still used include pyrethroids and organophosphates. Pyrethroids are commonly used against pests as they have low levels of toxicity to mammals, low environmental impact, and high effectiveness against a wide range of insects. In addition, low quantities are needed to acquire good results. On the other hand, in certain cases, the use of pyrethroids brings an increased risk of intoxication to certain species, including poultry, fish, and bees [50, 51]. The insecticide DDE (2,2- bis-*p*-chlorophenyl-1,1-dichloroethyl) a metabolite of DDT (1,1'-(2,2,2-Trichloroethane-1,1-diyl)bis (4-chlorobenzene), have indicated to have an effect on poultry and is considered responsible for the deficiency of egg shell production . This type of control method against *A. diaperinus* is applied as an insecticide powder at each exit of aviaries. It is applied on walls, pillars, beams, sleepers, scissors, borders, food containers, and on the floor [29, 51, 52].

Research has also focused on phosphine gas (PH₃) which is extremely toxic to insects and it is the fumigation agent most commonly used against pests in stored grains. Its action mechanisms are based on the partial inhibition of the electron transport chain causing lipid peroxidation which results in cellular damage followed by death of the insects [53]. Gazoni *et al.*, [42] tested phosphine gas under both laboratory and field conditions by exposing the insects

to the gas for 30, 60, and 90 minutes, and found 100 % mortality after 90 minutes of exposure, both in the laboratory and field tests.

In agreement with certain studies, the effectiveness of control methods can be limited due to the accumulation of organic matter on treated surfaces and chicken bedding regardless of *A. diaperinus* being susceptible to various insecticides with a residual effect [9, 54]. In addition, the avoidance behaviour of these insects makes chemical insecticides less effective, since insecticides are only applied to the surface of the bedding [48].

In this manner, it is crucial to look for alternative conventional control methods such as physical (cleaning, management of bedding and blinds) and chemical methods, particularly those methods that do not generate damage to animal or human health. One must also consider the biological cycle of the insect, and other difficulties caused by incorrect use of pesticides, excessive application of chemicals, product resistance, and increased production costs [42, 55, 56].

Biological control

There are various biological control programmes for pests with emphasis on the application of entomopathogens, mainly for the safety of poultry, as entomopathogenic fungi are considered safe both for humans and for the environment, and brings no risks to homeothermic animals [57].

There are several reports regarding natural occurrence of entomopathogenic fungi infecting *A. diaperinus* in Brazilian and American aviaries, and regarding isolated selections against this pest, in particularly *Beauveria bassiana* (Hypocreales; Cordycipitaceae) and *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) [13, 14, 48, 57, 58].

In Brazil, published data related to this matter are restricted to *in vitro* tests on the selection of these fungi isolates, showing the susceptibility of these insects to these agents and the virulence variability of the isolates [10, 59].

Beauveria bassiana is a fungus that commonly infects insects. It is one of the most promising agents for the biological control of arthropods, as it remains in the host population, causing high mortality rates in both adults and larvae, and is easily pulverised. However, entomopathogenic fungi are slow-acting, and most of them require appropriate temperature and humidity in order to maintain viability and pathogenicity [61].

Regardless of the increased mortality rate observed in laboratories, the use of *B. bassiana* is limited by the product formulation and application methods [42, 62, 63, 64]. There are not enough studies evaluating the potential of these fungi to control insects in aviaries.

Rohde *et al.* [13] obtained a percentage mortality of *A. diaperinus* between 6.7 and 100% for larvae and 86.7 % for adults, with different *B. bassiana* isolates. These results confirm the data obtained by Lambkin [60], which indicated that *B. bassiana* is the most effective fungus for the control of *A. diaperinus* in poultry bedding. Gazoni [65] evaluated a *B. bassiana* isolate for the biological control of *A. diaperinus* together with wood shavings at a concentration of $3.83 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$, 32.5 °C, 72.4 % humidity, during seven days, and under laboratory conditions. No mortality was shown for larvae or adult insects, which could be due to the low virulence of the isolate against *A. diaperinus* since it was obtained from ticks and not from natural infection (WV). Geden [62] used two *B. bassiana* isolates, one having been obtained from lesser mealworm larvae through natural infection (WV) and the other from flies (NC). The mortality rate of insects was higher with the WV isolate, reaching 100 % efficiency, in comparison to NC at a concentration of 10^{11} conidia per mL^{-1} .

Bacillus thuringiensis (Bt) is an aerobic gram-positive soil bacterium with entomopathogenic activity. This bacterium is considered as the main pathogen for insect pest control because it produces crystal proteins, also known as δ - endotoxins which are toxic for coleopteran insects, including the Cucujidae, Tenebrionidae, and Nitidulidae families [66, 67].

Entomopathogenic nematodes such as *Steinernema glaseri* and *S. carpocapsae* (Steinernematidae) have also been evaluated in lesser mealworm larvae and adults, showing that larvae are more susceptible than adults and that the nematode *S. carpocapsae* showed a superior pathogenicity to that of *S. glaseri* [57]. They also act in association with bacteria in a symbiotic

relationship and localise the host through different search strategies, invading the insect through natural openings (mouth, spiracles, anal opening). When they reach the insect's haemocoel, they release the associated bacteria which kill the host between 24 and 72 hours after invasion [68].

According to Aguilera *et al.*, [68], the nematodes and the bacteria multiply within the insect's body, and after two to three generations the formation of infective juveniles begins, they later leave the cadaver and look for new hosts. Products based on nematodes and entomopathogenic fungi are only produced under laboratory conditions and not on a large scale; studies investigating the application method in aviaries are therefore necessary [69]. According to Oliveira [70] the use of entomopathogenic fungi can be used to control pests such as *A. diaperinus*, as long as they are part of Integrated Pest Management (IPM).

Amongst the benefits of using biological control is the efficiency of applicators, environmental protection and chemical-free carcasses which can be marketed [71].

Control using Products with plant origin

The concern and search for healthier food has encouraged the search for new insecticides of natural origins, as they are considered to be safer than the synthetic ones because they degrade more easily and do not leave residues on food or in the environment. Plant substances are more beneficial than synthetic pesticides due to their persistence and accumulation in the environment. In addition, they do not leave residues on food, and they are biodegradable, thus having a decreased toxicity level to animals. Finally, they have compatibility with other control methods [72, 73].

There are several studies involving numerous plant species used for the control of various pests, species that have shown and proven their action against insect pests. In recent years, the search for new plants with insecticide activity as an alternative to synthetic insecticides has become a key point in pesticide research, including essential oils present in various plants. Essential oils consist of small volatile molecules. They are classified as secondary plant metabolites and are a mixture of complex molecules that have been thoroughly

researched in order to assess their properties as repellents and close-range insecticides [74, 75, 76].

Some effects that essential oils and plant extracts have on insects are: lengthening of the different phases in the biological cycle, and the occurrence and deformation and death during these phases. They can also cause problems with digestion, absorption of nutrients, and metamorphosis of the insects. Studies have shown the efficiency of plant oils and extracts as agents to control insect pests and efficient control of *A. diaperinus* (Table 1) [77, 78, 79, 80].

Amongst the different plant oils tested as a measure against the lesser mealworm, the neem oil from the *Azadirachthina indica* (Meliaceae) plant showed potential control of insects by slowing down growth and development of the larvae through reduction and inhibition of food intake, and occasionally it caused death of adult *A. diaperinus* [81, 82, 83].

The derivatives of neem oil stand out because they have shown efficiency against several insect pests as they contain insecticidal substances. Within the 40 identified plant terpenoids that act against insects, azadirachtin is the most efficient compound found in all parts of the plant. These compounds show great potential as a control agent against pests; they have extremely low toxicity to vertebrates, and have a low impact on the environment [84, 85].

Marques *et al.*, [86] evaluated the effect of neem oil and of the essential citronella oils (*Cymbopogon wynterianus*) (Poaceae) at the following concentrations: 1, 3, 5, 7, and 9% with water as a control and 5, 10, 15, 20% with coconut soap (10 g/L) as control. The mortality rate against *A. diaperinus* was found to vary between 14 to 47 % within the first 14 hours after application of neem oil; the citronella oil caused a mortality rate of 45 to 74 % within the first 24 hours of application. The essential citronella oils also showed an insecticidal effect against other coleopterans (*Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), that are important pests of stored grain [87].

Azevedo *et al.*, [83] studied the effect of neem on *A. diaperinus* in stored nuts, and checked mortality after 90 and 120 days (the insects have a lifespan of 720 days depending on environmental conditions) at concentrations of 3 to 4 %; growth regulation effects (damaging effects of the larval metamorphosis), deterrent of feeding, and protection of nuts from damage

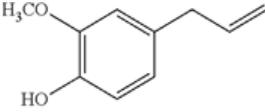
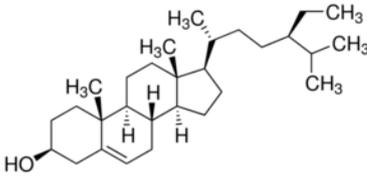
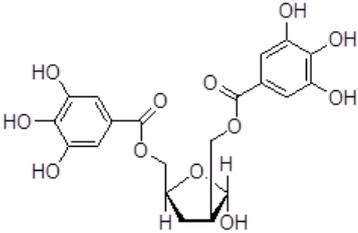
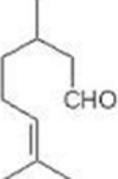
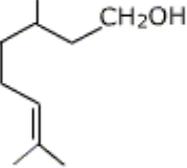
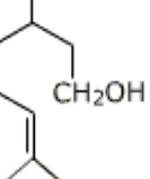
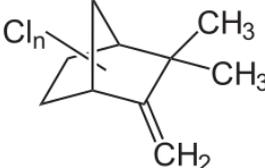
caused by the pest. Marcomini *et al.*, [88] tested, under laboratory conditions, a liquid mint extract (*Mentha* sp.) (Labiatae) and five plant extracts: basil in ethanol (*Ocimum* sp.) (Lamiaceae), sweet potato (*Smallantus sanchifolius*) (Asteraceae), orange trumpetvine (*Pyrostegia venusta*) (Bignoniaceae), eucalyptus (*Eucaliptus* sp.) (Myrtaceae), pau fava (*Senna macranthera*) (Fabaceae), for the control of *A. diaperinus* (Table 1). In agreement with the authors, there was a significant mortality in the larval phase when using basil and orange trumpetvine extracts, with a mortality rate over 40 %. For adult insects, only eucalyptus had a mortality rate higher than 26 %.

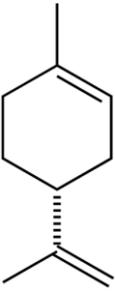
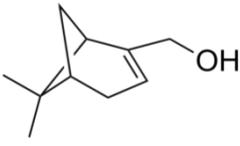
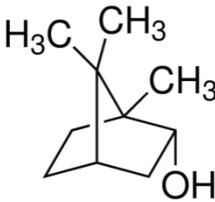
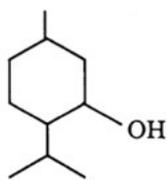
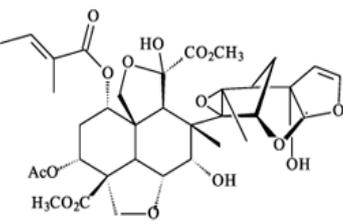
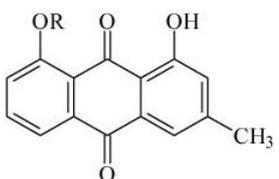
The insecticidal effects of the plants on insect pests vary according to the method of extraction, the life-cycle stage of the insect, application of product, room temperature and humidity [88].

Table 1: Plants with insecticidal activity against *Alphitobius diaperinus*

Plants (common name)	Plant species	Family	Active compounds	Extract type	Reference
Basil	<i>Ocimum</i> sp	Lamiaceae	Eugenol	Crude extract	[88]
Sweet potato	<i>Smallantus sanchifolius</i> Poepp.	Asteraceae	Fructane, Chlorogenic acid	Crude extract	[88]
Orange trumpetvine	<i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers	Bignoniaceae	Allantoin,β-sitosterol, tannins	Crude extract	[88]
Citronella	<i>Cymbopogon wynterianus</i> Jowitt	Poaceae	citronella , geraniol and citronellol	Essential Oil Essential Oil	[86]
Eucalyptus	<i>Eucalyptus</i> sp	Myrtaceae	Camphene, limonene, myrtenol and borneol	Crude extract	[88]
Mint	<i>Mentha</i> sp	Labiatae	Menthol	Essential Oil /Extract	[88]
Neem	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	Meliaceae	Azadiractine	Essential Oil	[83]
Pau fava	<i>Senna macranthera</i> (Collad.) H.S.Irwin & Barneby	Fabaceae	Chrysophanol	Crude Extract	[88]

Table 2: Chemical formulae of active compounds of insecticidal plants

Active compounds in insecticidal plants	Chemical structure	Reference
Eugenol		[88]
β-Sitosterol		[88]
Tannin		[88]
Citronellal		[86]
Geraniol		[86]
Citronellol		[86]
Camphene		[88]

Limonene		[88]
Myrtenol		[88]
Borneol		[88]
Menthol		[88]
Azadiractine		[83]
Chrysophanol		[88]

Semiochemicals used in Integrated Pest Management

The damage caused to crops by the indiscriminate use of chemical products, causing insecticide resistance in addition to the harm caused to humans and the environment, together with the international market demand for pesticide-free products, has given rise to the need to work on an ecological and economical way to control the insects [89].

From this need came forth behavioural studies on several pest species and also crop monitoring, to verify the presence and level of infestation in agriculture. The use of traps with pheromones as bait can detect the presence and the density of a pest as well as the level of “economic damage”, making it possible to use semiochemicals as a tool in integrated management.

Integrated Pest Management (IPM) is a system that aims to preserve and increase the natural mortality factors of pests through the integrated use of selected control methods based on technical, economical, ecological and sociological parameters in a way that keeps pest infestation at a level low enough not to cause “economic damage” [90].

Communication through chemical compounds is one of the most important forms that insects exert in their ecological relations with the environment and with other organisms. These compounds, known as semiochemicals, act as triggers of specific physiological and behavioural reactions. It is through the detection and emission of these compounds that insects find mates to breed, food, oviposition sites, aggregations, and defence against predators [91]. Pheromones are safe tools because they manage to control insect population through the manipulation of sexual communication without affecting the benefits of the organisms. The use of chemical substances, behavioural modifiers of species-specific action to control an insect that is harmful to agriculture and disease vectors was the base of pheromone research that began more than fifty years ago (1959), that has led to the discovery of hundreds of pheromones and semiochemicals used to monitor the presence and abundance of insects and to protect plants and animals [92].

According to Vilela and Della Lucia [93] and Goulart [94], there are two alternatives for the use of pheromones in the management of insect pests: monitoring by using traps, or through

control mainly by techniques of mass collection, attract-and-kill, sexual disruption and push-pull.

Monitoring using traps involves using lures with specific quantities of pheromones that attract the males or female insects. The application of insecticide depends on the number of insects caught. It is possible to determine absence, presence, or population fluctuation of a determined species in areas in which monitoring is conducted, and this helps the producer to decide on an appropriate control method [93, 94].

Mass trapping uses sexual or aggregation pheromones in variable quantities per hectare, according to the species, based on regular surveys, and based on the reduction of insects per collection. Aggregation pheromones attract both males and females. This method is particularly used against coleopterans, to reduce the application of insecticides. One example is the use of Rincophorol which is the aggregation pheromone for the South American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum* (Curculionidae). Baited traps usually contain this pheromone and pieces of sugar cane as it attracts both sexes, thus reducing the insect population [95]. The confounding technique is based on the release of pheromones, which prevents them from finding a mating partner [96].

In the attract-and-kill technique, the pheromone is applied together with an insecticide. The pheromone attracts the pest in a specific way which increases the chances of contact between insect and insecticide, thus increasing the control potential. Through localised application, the insecticide is prevented from reaching the environment and the commercial product; this technique is used against apple tree pests, such as *Bonagotasa lubricola* and *Grapholita molesta* (Tortricidae) [97].

Sexual confounding is a control method akin to mass trapping, in which mating is stopped. It is based on the interference with, or impairment of, transmission signals between mates. This method reduces the mating rate, and hence weakens a new pest generation (94).

The “Push-Pull” approach is a strategy also known as stimulus-inhibition targeting. This is the newest strategy used in IPM, and consists of the combination of repellence and attraction stimuli, modifying the behaviour of the pests, or of their natural enemies (94, 96, 98).

Coleopteran pheromones, a pest of stored grains

An increased grain production increases health problems, due to diseases and pests. Due to the need to protect stored grains from damage, in particularly long-term conditions, pheromones are considered crucial for the control of these pests [99].

Hundreds of pheromones belonging to insects of the Coleoptera and Lepidoptera orders that attack stored grains have been identified. These are volatile compounds with low molecular weight and diverse chemical structures [100]. Aggregation pheromones are mainly produced by beetles of the Bostrichidae, Curculionidae, Cucujidae, and Tenebrionidae families. These insects are characterised by their high feeding rate and long life span [101].

The first coleopteran pheromone belonging to a stored grain pest that was chemically identified was (*E,Z*)-3,5-tetradecadienoic acid (Figure 6, annex), a sex pheromone that is released by females of *Attagenus megatoma* (Coleoptera: Dermestidae), a bean pest [102].

Figure 6 Chemical structure of (*E,Z*)-3,5-tetradecadienoic acid

Researchers reported that the copulation behaviour of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae), a flour pest, is mediated by at least four compounds including an attractant produced by the female which was identified by Tanaka *et al.*, [103, 104] (Figure 7, annex) as R (+)-4-methyl-1-nonanol [105, 106].

Figure 7 Chemical structure of R (+)-4-methyl-1-nonanol

The bean weevil *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrysomelidae) is one of many stored bean pests; the male releases a sex pheromone that has been identified as methyl (R)-(E)-2,4,5 – tetradecatrienoate (Figure 8, annex) [107].

Figure 8 Chemical structure of methyl (R)-(E)-2, 4, 5 – tetradecatrienoate

Alphitobius diaperinus is a pest that causes great losses in poultry and agriculture, infesting stored grains such as soy and corn which are commonly used in preparation of animal feed. Bartelt *et al.*, [108] reported that the aggregation pheromone is released by the male and consists of five components: limonene, (*E*)- β -ocimene, linalool, daucene, and 2-nonanone (Figure 9). However, Hassemer *et al.*, [109] reported six components in the aggregation pheromone, identified as limonene, (*E*)- β -ocimene, 2-nonanone, (*S*)-linalool, (*R*)-daucene, and (*E,E*)- α -farnesene.

Figure 9 Chemical structures of the pheromone constituent of *A. diaperinus*.

Limonene (1), (*E*)- β -ocimene (2), linalool (3), 2-nonanone (4), (*R*)-daucene (5), and (*E,E*)- α -farnesene (6).

Conclusions and perspectives

The population increase favoured poultry production, providing success in modern cattle raising with the use of technologies used both in food production and in control of related pests. The movement known as “the green revolution”, an expression coined in 1966, caused major concerns regarding the quality of products offered to the consumer, with regard to pesticide residues [110].

In this context, several studies have been developed for integrated pest management in which various monitoring and control strategies are used together with natural bioactive compounds that act as pesticides as an alternative to synthetic compounds, including application of organic agriculture [89]. The search of biomolecules with greater selectiveness and lower toxicity to the environment, humans and insect species that are not pests, has been a priority.

together with natural repellents which provide new control tools that are less harmful to the environment and human health.

The use of semiochemicals has become a viable tool for integrated pest management, with numerous benefits linked to food production and the preservation of the environment. The studies conducted by Singh and Johnson [111], pointed out that the synthetic pheromone of *A. diaperinus* together with volatile attractants present in chicken faeces increased the number of captures in traps, indicating the need for more studies to prospect new attractants as well as the potential of semiochemicals as a tool for integrated management of this pest both in poultry farming and in storage environments.

In addition, it is worth highlighting the development of sensor devices based on the capture of specific semiochemicals of these insects such as pheromones which can lead to the correct identification of a species present in a given batch, as well as volatile pattern related to infestations by other insects or fungi. This kind of technology is used in food industries to evaluate the quality of the product and it can be useful to show the presence of fungal contamination and insect infestations in different stored products [112].

Recent advances in the development of portable sensors to detect various types of odours are being utilised for several applications including disease diagnostics. The production of devices based on the antennae of the insects and the interaction of OBPs (Odorant binding proteins) in biosensors indicate a promising path to attainment of efficient detection of infestations [113, 114].

Olfactory sensors based on metal oxide semiconductor devices, quartz crystal microbalances (QCM), or surface acoustic wave detectors have been developed for a variety of odour detection applications due to their physico-chemical stability and long term periods. However, the performance of these sensors is still inferior to the olfactory system of living organisms in terms of selectiveness, sensibility and response time [115].

In recent studies, a molecular marker was established for the identification of *A. diaperinus* that could contribute to increased knowledge regarding this species, and that could be used for future control strategies against this pest [116]. The use of biomarkers of high

reproducibility and material of high sensibility are necessary for the development of new monitoring techniques, which could favour decision -making regarding rational use of pesticides.

Bioacoustics has also been mentioned as being a useful tool for the detection of adults and for estimating population sizes of different pests, including lepidopteran *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae), and coleopterans *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) in batches of wheat and corn stored in small containers, using a piezoelectric sensor and an portable acoustic amplifier connected to a computer [117]. This type of technology allows the detection of contamination food batches, taking into consideration that the infesting insect emits sound when feeding, during flight, oviposition, and when moving. This is useful in poultry farming, and avoids the entry of insects into the aviaries through the food.

The computational process of the sensor records provided estimates of the level of grain infestation based on the number of pulses per minute, it generally had more than a 70% success rate in predicting the densities of *T. castaneum* and *T. confusum* [117]. These studies pointed out the need to improve the technologies based on bioacoustics for use in large volumes of grains and specific adaptations for *A. diaperinus* which may favour decision making in the Integrated Management of this pest, this method being both quick and easy. This method could be used not only for detection purposes, but also to estimate the population density of pests.

However, we must stress *A. diaperinus* is an insect that causes great losses in stored grains, in particularly in poultry farming, and that it is paramount to highlight that all these advances in knowledge and innovative technologies against this pest need improvements directed to large infestations, also allowing the access of small producers to new tools that minimize the use of pesticides and boost the efficiency when controlling this insect.

Abbreviations

TD: Diatomaceous earth; DDE: 2,2-bis-p-chlorophenyl-1,1-dichloroethyl; DDT: 1,1'-(2,2,2-Trichloroethane-1,1-diyl) bis(4-chlorobenzene); NC: Flies; BT: *Bacillus thuringiensis*; IPM: Integrated pest management;

Acknowledgements

The authors wish to thank to Dr. Antônio Euzébio for proofreading the manuscript and providing valuable suggestions.

Funding

Not applicable.

Availability of data and materials

Not applicable.

Authors' contributions

JCV wrote the manuscript under the guidance of AEGS and both authors read and approved the final version of the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interests

References

1. Oliveira DRMS, Nääs IA. Issues of sustainability on the Brazilian broiler meat production chain. *J Chem Inf Model*. 2012. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
2. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Brasil Projeções do Agronegócio 2011/12 a 2021/22. Brasília, 2012, 50 p. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: abril de 2016.
3. Dai PRA, M.A.; Roll, V.F.B. Cama de aviário: Utilização, reutilização e destino. 1. ed. Porto Alegre: Editora Manas/Evangraf. 2012.
4. Vieira NM, Dias RS. Uma abordagem sistêmica da avicultura de corte na economia brasileira. In: congresso da sociedade brasileira de economia e sociedade rural, 43, Ribeirão Preto. 2005. [Resumo]. Ribeirão Preto.
5. Avisite. <http://www.avisite.com.br>. Consultado em 29/09/2017.
6. Ubabef, 2016. União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual 2012/2015. São Paulo. Disponível: <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761>. Acesso em 20 junho. 2016.
7. Abreu VMN, Paiva DPde, Abreu PGde, & Coldebella A. Evaluation of litter material and ventilation systems in poultry production: III. litter reuse, darkling beetle populations and intestinal parasites. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(6), 1372-1380. 2011. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982011000600028>.
8. Chinivasagam HN, Redding M, Runge G, Blackall PJ. Presence and incidence of food-borne pathogens in Australian chicken litter. 2010. Pag. 311-318. <http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2010.499424>.
9. Japp AK, Bicho C de L, Silva AVFda. Importância e medidas de controle para *Alphitobius diaperinus* em aviários. *Ciência Rural*. 2010. 40:1668–1673. doi: 10.1590/S0103-84782010005000114.
10. Rezende SRF: Fungos entomopatogênicos no controle do *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) como estratégia de biossegurança na avicultura. MsC Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brasil. 2009.

11. Rodrigueiro, TSC. Distribuição espacial, bioensaios com nematoides entomopatogênicos e inseticidas em população de *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae), de aviário de corte do Estado de São Paulo: subsídios para programas de manejo integrado e controle biológico. 131 p. PhD Thesis. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. Campinas. 2008.
<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/317985>
12. Mendes, LR; Povaluk, M. Ciclo e controle do *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera, Tenebrionidae) no município de Quitandinha, PR. Saúde Meio Ambiente. 2017. V.6, n. 1, p. 107-122.
13. Rohde C, Alves LFA, Neves PMOJ, Alves SB, Silva ERL da, Almeida JEM de. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). Neotropical Entomology, 2006. v. 35, n. 2, p. 231- 240.
14. Chernaki-Leffer AM, Sosa-Gomez DR, Almeida LM. Selection for entomopathogenic fungi and LD50 of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. for the Lesser Mealworm *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). Revista Brasileira de Ciencia Avicola; 2007. 9:187-191b. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2007000300008>.
15. Spilman, TI. Darkling beetles (Tenebrionidae, Coleoptera). Washington, D.C.: United States Government Printing Office.1991. v.1, p. 310.
16. Ferreira E (2011). In the: Uso de nim no controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em vagens de amendoim armazenado. DSpace UEPB, 2011. <http://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/123456789/189>. Accessed 26 sept 2017.
17. Silva GS, Veronez VA, Oliveira GP, Borges FA, Silva HC, Meireles MV. Avaliação de métodos de amostragem de “Cascudinho” *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) em cama de frangos de corte. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 2001, v. 22, p. 73-76. DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2001v22n1p73>.
18. Bicho C de L, Almeida LM de, Ribeiro PB, Silveira Júnior P (2005) Flutuação populacional circanual de coleópteros em granja avícola, em Pelotas, RS, Brasil. Iheringia Série Zool 95:205–212. doi: 10.1590/S0073-47212005000200011.
19. Camargo Neto A, Tallarico E, Capriogli M, et al. Seasonal variation of *Alphitobius diaperinus* population in broiler facilities in the center-north region of the state of São Paulo. Rev Bras Ciência Avícola 8:183–185. 2006. doi: 10.1590/S1516-635X2006000300008.

20. Japp AK: Influência do *Aphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera, Tenebrionidae) no desempenho zootécnico de frangos de corte e avaliação da terra de diatomácea como estratégia para o seu controle. 58f. MsC Thesis. Universidade Federal do Paraná, PR. 2008.
21. Templeton JM, De Jong AJ, Blackall PJ, Miflin JK. Survival of *Campylobacter spp.* in darkling beetles (*Aphitobius diaperinus*) and their larvae in Australia. *Appl Environ Microbiol* 72:7909–7911. 2006. doi: 10.1128/AEM.01471-06.
22. Leffer AM, Kuttel J, Martins LM, et al. Vectorial competence of larvae and adults of *Aphitobius diaperinus* in the transmission of *salmonella enteritidis* in poultry. *Vector-Borne Zoonotic*. 2010. Dis 10:481–487. doi: 10.1089/vbz.2008.0089.
23. Giambrone, JJ, Macklin, KS. Detection of infectious *laryngotracheitis* virus from darkling beetles and their immature stage (lesser mealworms) by quantitative polymerase chain reaction and virus isolation. *Journal of Applied Poultry Research*. 2012. v. 21, n. 1, 33-38. <http://dx.doi.org/10.3382/japr.2010-00314>.
24. Hilbert F, Smulders FJM, Chopra-Dewasthaly R, Paulsen P. *Salmonella* in the wildlife-human interface. 2012. *Food Res Int* 45:603–608. doi: 10.1016/j.foodres.2011.08.015.
25. Paiva, DP. Cascudinhos: biologia. Simpósio Brasil Sul de Avicultura, 1, 2000, Chapecó. [Resumo]. Chapecó, p. 135-139. Paiva, M. R. & Pedrosa-Macedo, J. H. P. 1985. *Feromonas de Insetos*. Curitiba: GTZ, 94 p.
26. Bates C, Hiatt KL, Stern NJ. Relationship of *Campylobacter* isolated from poultry and from darkling beetles in New Zealand. 2004. *Avian Dis* 48:138–147. doi: 10.1637/7082
27. Chernaki-Leffer A, Biesdorf S, Almeida L, et al. Isolamento de enterobactérias em *Aphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. *Rev Bras Ciência Avícola*. 2002. 4:243–247. doi: 10.1590/S1516-635X2002000300009.
28. Vittori J, Schocken-Iturrino P, Trovó KP, Ribeiro CAM, Barbosa GG, Souza LM, Pigatto CP. *Aphitobius diaperinus* como veiculador de *Clostridium perfringens* em granjas avícolas do interior paulista – Brasil. *Ciência Rural*, 2007. v. 37, n. 3, p. 894 – 896.
29. Chernaki-Leffe AM, Almeida LM. Exigências térmicas, período de desenvolvimento e sobrevivência de imaturos de *Aphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, 2001 a. v.30, n.3, p.365-368. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2001000300004>.

30. Roche, AJ, Cox, NA, Richardson, LJ, Buhr, RJ, Cason, JA Fairchild, BD, Hinkle, NC. Transmission of Salmonella to broilers by contaminated larval and adult lesser mealworms, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). Poultry Science. 2009. v. 88, n. 1, p. 44-48. doi:10.3382/ps.2008-00235.
31. Hoelzer K, Switt AIM, Wiedmann M. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. 2011. Vet Res 42:1–27. doi: 10.1186/1297-9716-42-34.
32. Del Valle EE, Frizzo L S, Malmierca M, Zbrun M V, Lax P, Doucet ME (2016) Biological control of *Alphitobius diaperinus* with *Steinernema rarum* CUL and *Heterorhabditis bacteriophora* SMC and feasibility of application in rice hull. J Pest Sci 89:161–170. DOI 10.1007/s10340-015-0669-8.
33. Wolf, J: Associação de métodos químicos e físicos visando o controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera:Tenebrionidae). 116f. MsC Thesis. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos. 2013.
34. Lay, DCJR, Fulton, RM, Hester, PY, Karcher, DM, Kjaer, JB, Mench, JA, Mullens, BA, Newberry, RC, Nicol, CJ, O’Sullivan NP, Porter, RE. Hen welfare in different housing systems. Poultry Science, 2011. v. 90, n. 1, p. 278-294. doi: 10.3382/ps.2010-00962.
35. Salin, C, Delettre, YR, Cannavacciuolo, M, Vernon, P. Spatial distribution of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) in the soil of a poultry house along a breeding cycle. European Journal of Soil Biology, 2000. v.36, n.2, p.107-115. [http://dx.doi.org/10.1016/S1164-5563\(00\)01054-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1164-5563(00)01054-2).
36. Pinto, DM, Ribeiro, PB, Bernardi, E. Avaliação de métodos para monitorar populações de artrópodes em granja avícola, em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 2007. v.74, n.2, p.95-99.
37. Elowni EE, Elbiharis S. Natural and experimental infection of the beetle *Alphitobius diaperinus* with *choanotaenia infundibulum* and other chicken tapeworms. Veterinary Science Communications, 1979. v. 3, p. 171-173. doi: 10.1007.
38. Silva, AS, Hoff, G, Doyle, RL, Santurio, JM, Monteiro, SG. Ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. Acta Scientiae Veterinariae. 2005. v. 33, n. 2, p. 177-181.
39. Esquivel JF, Crippen TL, Ward AL (2012) Improved Visualization of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)—Part I: Morphological Features for Sex

Determination of Multiple Stadia. Hindawi Publishing Corporation, Psyche.

<http://dx.doi.org/10.1155/2012/328478>.

40. Mcallister, JC, Steelman, CD, Newberry, LA, Skeeles, JK. Isolation of infectious bursal disease virus from the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). Poultry. Science. 1995. v.74.p. 45-49.
41. Berchieri Júnior A; Freitas Neto OC. Salmoneloses. In: Berchieri Júnior A; Silva EN; Di Fábio J; Sesti L; Zuanaze MAF. Doenças das aves, 2ª edição, Ed. FACTA, Campinas, 2009.
42. Gazoni FL, Flores F, Bampi RA, Silveira RB, Lovato M. Avaliação da resistência do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) a diferentes temperaturas. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 2012. v.79, n.1, p.69-74.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1808-16572012000100010>.
43. Ebeling W. Sorptive dusts for pest control. Annual Review of Entomology, 1971. v.16, p.123-158. doi: 10.1146/annurev.en.16.010171.001011.
44. Korunic Z. Review Diatomaceous Earth, a group of natural insecticides. Journal Stored Product Research, 1998. v.34, n.23, p.87- 97. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(97\)00039-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(97)00039-8).
45. Stathers TE et al. The efficacy and persistence of diatomaceous earths admixed with commodity against four tropical stored product beetle pest. Journal of Stored Products Research., 2004. v.40, p.113- 123.
46. Alves LFA et al. Ação da terra de diatomácea contra adultos do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). Arquivos do Instituto Biológico, 2006. v.73, n.1, p.115-118.
47. Viana MAO. Resposta à ação de terra diatomácea no controle de *Alphitobius diaperinus* em granjas de frango de corte. [Resumo]. 9º Seminário Anual de Iniciação Científica, 19 a 21 de outubro de 2011, Amazonas.
48. Alves LFA, Alves VF, Bressan DF, Neves PMOJ, Alves SB. Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em adultos de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) em aviários comerciais em Cascavel, PR. Neotropical Entomology, Londrina, PR, 2004. v. 33, n. 6, p. 793-795. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2004000600018>.

49. Chernaki-Leffer AM, Sosa-Goméz DR, Almeida LM, Lopes ION. Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera, Tenebrionidae) to cypermethrin, dichlorvos and triflumuron in Southern Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 2001. v.55, p.125-128, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262011000100020>.
50. Queiroz SCN, Collins CH, Jardim ICSF. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quim. Nova*, 2001. v.24, n.1, p.68-76.
51. Grisolia CK. Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. Brasília: Editora Universidade de Brasília, p. 392. 2005.
52. Hamm PB, Hy CW, Hutchinson PJ, Stevenson WR, Boydston RA, Alvarez JM, Alyokin A, Dively G, Gudmestad NC, and Kirk WW. Managing pesticide resistance. In *Potato Health Management. Plant Health Management Series* (Ed. D.A. Johnson). American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA. Second Edition. Pp 123-131.2008.
53. Bequisa. Fosfato de alumínio. www.bequisa.com.br/produtos. Revista Bequisa. Accessed 06/2016.
54. Despin JL, Turner EC JNR, Pfeiffer DG. Evaluation of methods to protect poultry house insulation from infestations by lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Agricultural Entomology*, v. 8, p. 209-217, 1991.
55. Prado GP. Caracterização química e bioatividade do óleo essencial de *Cunilaan gustifolia* Benth (Lamiaceae) sobre *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). MSc Thesis. Universidade Comunitária Regional de Chapecó. 74p. Chapecó, 2007.
56. Wang CF, Yang K, Zhang HM, Cao J, Fang R, Liu ZL, Du SS, Wang YY, Deng ZW, Zhou L. Components and insecticidal activity against the maize weevils of *Zanthoxylum schinifolium* fruits and leaves. *Molecules* 16: 3077–3088. 2011. doi:10.3390/molecules16043077.
57. Alves LFA et al. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* S. *carpocapse* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, v.34, n.1, p.139-141, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2005000100022>.

58. Santoro PH, Neves PMOJ, Alexandre TM, Sartori D, Alves LFA, Fungaro M. Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*. Journal of Invertebrate Pathology; 2007. 97(2):83-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2007.07.009>.
59. Constanski KC, Neves PMOJ, Nogueira LM, Santoro PH, Amaro JT and Zorzetti J. Selection and evaluation of virulence of *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. Submitted to different temperature. Semina: CienciasAgrarias. 32(3): 875-882. 2011. DOI: 10.5433/1679-0359.2011v32n3p875.
60. Lambkin TA, Rural Industries Research and Development Corporation (2011). Trialling biological agents for the management of lesser mealworm in Australian broiler houses. Publication No. 11/033 Project No. PRJ-000097.
61. Alves LFA, Gassen MH, Pinto FGS, Neves PMOJ, Alves SB. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Moniliales: Moniliaceae) sobre o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em aviário comercial de Cascavel, PR. Neotropical Entomology; 2005. 34(3):507-510. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2005000300021>.
62. Geden CJ, Arends JJ, Rutz DA, Steinkraus DC. Laboratory evaluation of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) against the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), in poultry litter, soil, and a pupal trap. Biological Control 1998; 13:71-77. doi: 10.1006/bcon.1998.0647.
63. Alexandre TM, Alves LFA, Neves PMOJ, Alves SB. Efeito da temperatura e cama do aviário na virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) para o controle do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). Neotropical Entomology; 2006. 35(1):75-82. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2006000100011>.
64. Alves LFA, Oliveira DGP, Neves PMOJ. Fatores que afetam a eficiência da Terra de Diatomacea no controle de adultos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). Neotropical Entomology; 2008. 37 (6):716-722. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2008000600014>.
65. Gazoni FL, Flores F, Silveira F et al. Evaluation of *Beauveria bassiana* (1986) as a Biological Control of *Alphitobius diaperinus* in Poultry Bed of Wood Shavings. Acta Scientiae Veterinariae. 2012. 40(1): 1016.

66. Bravo A, Gill SS, Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, v. 49, n. 4, p. 423–435. 2007. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022.
67. Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011. DOI: 10.1016/j.ibmb.2011.02.006.
68. Aguilera MM et al. Controle biológico de *Diloboderus abderus* (Coleoptera: Melolonthidae): estudos preliminares com nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Steinernematidae e Heterorhabditidae). In: Reunião Sulbrasileira de Pragas do solo, 8. Londrina. Anais. Londrina: Embrapa Soja. 2001. Doc.172, p.202-207. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/CNPSO/18351/1/doc172.pdf>>.
69. Alves VS, Neves PMJO, Alves LFA, Moino JR, A, Holz N. Entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) screening for lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) control. *Revista Colombiana de Entomologia*, 2012. v. 38, n. 1, p. 76-80.
70. Oliveira DGP DE, Alves LFA, Sosa-Gómez DR (2014) Advances and Perspectives of the Use of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for the Control of Arthropod Pests in Poultry Production. *Brazilian Journal of Poultry Science Revista Brasileira de Ciência Avícola*. ISSN 1516-635X / v.16 / n.1 / 1-12. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2014000100001>.
71. Haas-Costa J, Alves LFA and Daros AA. Safety of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. to *Gallus domesticus* L. *Braz. arch. biol. technol.* [online]. 2010, vol.53, n.2 [cited 2017-10-02], pp.465-471. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151689132010000200027&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1678-4324. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132010000200027>.
72. Vieira PC, Fernandes JB. Plantas Inseticidas. IN: Simões, CMO, Sckenkel, EP, Gosmann, G, Mentz, LA, Petrovick, PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5° ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFSC, 1999. p.739-754.
73. Vieira PC, Mafezoli J, Biavatti MW. Inseticidas de origem vegetal. In: Corrêa AG, Vieira PC. *Produtos naturais no controle de insetos*. 2° ed. São Carlos: EDUFSCAR. 2007. p.69-109.

74. Jin M, Zhang Y, YE J, Huang C, Zhao M, Liu W (2010) Dual enantioselective effect of the insecticide bifenthrin on locomotor behavior and development in embryonic-larval zebrafish. *Environmental Toxicology Chemistry* 29: 1561–1567. doi: 10.1002/etc.190.
75. Stefanazzi N, Stadler T, Ferrero A (2011) Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Pest Management Science* 67: 639–646. doi: 10.1002/ps.2102.
76. Jiang ZL, Akhtar Y, Zhang X, Bradbury R, Isman MB. Insecticidal and feeding deterrent activities of essential oils in the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*, 2012. 136: 191–202. doi: 10.1111/j.1439-0418.2010.01587.x.
77. Marcomini AM, Alves LFA, Bonini AK, Mertz NR, Santos JC. Atividade Inseticida de extratos vegetais e do óleo de nim sobre adultos de *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera, Tenebrionidae). *Arquivos do Instituto Biológico*. São Paulo, 2009. v.76, n.3, p.409-416.
78. Szczepanik M, Szumny A. Insecticidal activity of star anise (*Illicium verum* Hook. F.) fruits extracts against lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae). *Allelopathy Journal* 27: 277–288. 2011.
79. Abd El-Aziz Mf. Bioactivities and biochemical effects of marjoram essential oil used against potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae). *Life Science Journal* 8: 288–297. 2011.
80. Szczepanik M, Zawitowska B, Szumny A. Insecticidal activities of *Thymus vulgaris* essential oil and its components (thymol and carvacrol) against larvae of lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae). *Allelopathy Journal* 30: 129–142. 2012.
81. Szczepanik M. Studies on the biological activity of azadirachtin lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* Panzer. In: Konopinska, D. (Ed.). *Arthropods -chemical, physiological and environmental aspects*. Poland: University of Wrocław. 2001. p. 228-233.
82. Tabassum R, Naqvi SNH, Jahan M, Nurulain SM. Determination of the toxicities of fenpropathrin (Pyrethroid) and nim formulation (RB+PBO+Tx-100) against *Alphitobius diaperinus* adults and their effects on transaminases. *Turkish Journal of Zoology*, Turkey, 1998. v. 22, n. 4, p. 319-322.

83. Azevedo, AI B, Lira, AS, Cunha, LC, Almeida, FAC, Almeida, RP. Bioatividade do óleo de nim sobre *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) em sementes de amendoim. *Revista Brasileira Engenharia Agrícola Ambiental*, 2010. v.14, n.3, p.309–313.
84. Bruneton J (1995) *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. Andover: Intercept. 915p. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1026(199601)11:1<75::AID-FFJ561>3.0.CO;2-9.
85. Carneiro S M de TPG, Pignoni E, Vasconcellos ME da C, Gomes JC. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. *Summa Phytopathology*, 2006. v.33, n.1, p.34-39.
86. Marques CRG, Mikami AY, Pissinati A, Pivas LB et al. Mortalidade de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) por óleos de nim e citronela. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 2013. v. 34, n. 6, p. 2565-2574.
87. Al-Jabr AM. Toxicity and repellency of seven plant essential oils to *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences)*, Al-Ahssa, Saudi Arabia, 2006. v. 7, n. 1, p. 49-60.
88. Marcomini AM, Alves LFA, Nogueira MA et al. (2005) Avaliação preliminar de extratos vegetais para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera; Tenebrionidae). UNICENTRO XIV EAIC - Encontro Anual de Iniciação Científica - Guarapuava.
89. Dayan FE, Cantrell CL, Duke SO. Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 4022. doi:10.1016/j.bmc.2009.01.046.
90. Lima EABF, Ferreira CP and Godoy WAC. Ecological modeling and pest population management: a possible and necessary connection in a changing world. *Neotrop. entomol.* [online]. 2009, vol.38, n.6, pp.699-707. ISSN 1519-566X. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2009000600001>.
91. Zarbin PHG, Rodrigues MACM, Lima ER. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. *Química Nova*, 2009, 32, 72.
92. Witzgall P, Kirsch P, Cork A. Sex Pheromones and Their Impact on Pest Management. *Journal of Chemical Ecology*, 2010, 36, 80. doi: 10.1007/s10886-009-9737-y.
93. Vilela EF, Della Lucia TMC. Introdução aos semioquímicos e terminologia. In: Vilela, E. F. & Della Lucia, T. M. C. (eds.) *Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas*. 2001, 2. ed. Riberão Preto: Holos, p. 9 – 12.

94. Goulart HF, Lima MRF, DE Moraes RKS, Bernardo VB. Feromônios: Uma Alternativa Verde para o Manejo Integrado de Pragas. *Rev. Virtual Quim.*, 2015, 7 (4), 1205-1224. doi: 10.5935/1984-6835.20150068.
95. Navarro DMAF, Murta MM, Duarte AG, Lima IS, Nascimento RR, Sant'ana AEG. Aspectos práticos relacionados ao uso do rincoforol, o feromônio de agregação da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) no controle de pragas do coqueiro. *Análise de sua eficiência em campo. Química Nova*, 2002, 25, 32.
96. Pickett JA, Woodcock CM, Midgea CAO and Khan ZR (2014) Push–pull farming systems. *Curr. Opin. Biotechnol*, 2014, 26, 125–132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.006>.
97. Pastori PL, Arioli CJ, Botton M, Monteiro LB, Stoltman L, Mafra-Neto A. Integrated control of two tortricid (Lepidoptera) pests in apple orchards with sex pheromones and insecticides. *Revista Colombiana Entomologia*, 2012, 38, 224.
98. Cook SM, Khan ZR, Pickett JA. The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annual Review of Entomology*, 2007, 52, 375. DOI: 10.1146/annurev.ento.52.110405.091407.
99. Cox PD, Collins LE. Factors affecting the behavior of beetles pests in stored grain, with particular reference to the development of lures. *J. Stored Prod. Res.*, New York, 2002, v. 38, p. 95-115.
100. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. <<http://www.pherobase.com>>. Accessed 25 may 2017.
101. Burkholder, WE. Practical use of pheromone and other attractants for stored products insects. In: Ridgway, R. L.; Silvestein RM, Inscoc MN (Ed.). *Behavior-modifying chemicals for insect management*. New York: M. Dekker, 1990. P. 497-515.
102. Silverstein RM et al. Sex attractant of black carpet beetle. *Science*, Washington, 1967, v. 157, p. 85-87.
103. Tanaka Y et al. A sex attractant of the yellow meaworm, *Tenebrio molitor* L., and its role in the mating behavior. *J. Pest. Science.*, v. 11, p. 49-55, 1986. ISSN: 1612-4766.
104. Tanaka Y et al. Absolute configuration of a sex attractant the yellow meaworm, *Tenebrio molitor* L., *J. Pest. Science.*, v. 14, p. 197-202, 1989. ISSN: 1612-4766.

105. Tschinkel W, Willson C, Bern HA. Sex pheromone of the mealworm beetle (*Tenebrio molitor*). J. Exp. Zool. Philadelphia, 1967, v. 164, p. 81-86. doi: 10.1002/jez.1401640108.
106. August CJ. The role of male and female pheromones in the mating behavior of *Tenebrio molitor*. J. Insect Physiol., Oxford, 1971, v. 17, p. 739-751. doi: 10.1016/0022-1910(71)90120.
107. Horler DF (1970) (-) Methyl-N-Tetradeca- Trans-2, 4,5-Trienoate an allenic ester produced by male dried bean beetle, *Acanthoscelides obtectus* (Say) J. Chem. Soc., London, 1970, v. 6, p. 859. doi:10.1039/J39700000859.
108. Bartelt RJ, Cossé, AA & Zilkowski, BW (2009) Male-produced aggregation pheromone of the lesser mealworm beetle, *Alphitobius diaperinus*. J Insect Behav., Vol.28(2), pp.202-210. <https://doi.org/10.1007/s10905-015-9493-5>.
109. Hassemer MJ, Sant'Ana J, Borges M, et al (2016) Revisiting the Male-Produced Aggregation Pheromone of the Lesser Mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera, Tenebrionidae): Identification of a Six-Component Pheromone from a Brazilian Population. J Agric Food Chem, 2016. [acs.jafc.6b02235](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02235). doi: 10.1021/acs.jafc.6b02235.
110. Serra LS, Mesndes MRF, Soares MVA, Monteiro IP. Revolução Verde: reflexões acerca da questão dos agrotóxicos. Revista Científica do Centro de Estudos em Desenvolvimento Sustentável da UNDB) Número 4 – Volume 1 – jan/julho 2016 Periodicidade semestral. Disponível em: www.undb.edu.br/ceds/revistadoceds. Acesso em 04/10/2017.
111. Singh N, Johnson DT. Attractiveness of an Aggregation Pheromone Lure and Chicken Droppings to Adults and Larvae of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). J Econ Entomol, 2012. 105:2196–2206. doi: 10.1603/EC11422.
112. Hossain MDE, Rahman GMA, Freund MS, Jayas DS, White NDG, Shafai C, Thomson DJ. Fabrication and optimization of a conducting polymer sensor array using stored grain model volatiles. Agric Food Chem, 2012. 60:2863-2873. doi: [dx.doi.org/10.1021/jf204631q](https://doi.org/10.1021/jf204631q).
113. Martinez D, Arhidi L, Demondion E, Masson JB, Lucas P. Using insect electroantennogram sensors on autonomous robots for olfactory searches. J Vis Exp90:e51704. 2014. doi:10.3791/51704.
114. Mitsuno H, Sakurai T, Namiki S, Mitsuhashi H, Kanzaki R. Novel cell-based odorant sensor elements based on insect odorant receptors. Biosensors and Bioelectronics 287–

294. 2015. journal homepage: www.elsevier.com/locate/bios.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.026>.
115. Brattoli M, Degennaro G, Depinto V, Loiotile AD, Lovascio S, Penza M (2011) *Sensors*, 2011. 11,5290–5322. doi:10.3390/s110505290.
116. Sallet LAP. Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera:Tenebrionidae). Tese de doutorado. Universidade de Brasília. 2013.
117. Eliopoulos PA, Potamitis I, Kontodimas DCh. Estimation of population density of stored grain pests via bioacoustic detection. 2016. *Crop Prot* 85:71-78. doi:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2016.04.001>.

Figure 1 Development stages of Alphitobius diaperinus

[Click here to download Figure CICLO A. DIAPERINUS.pptx](#)

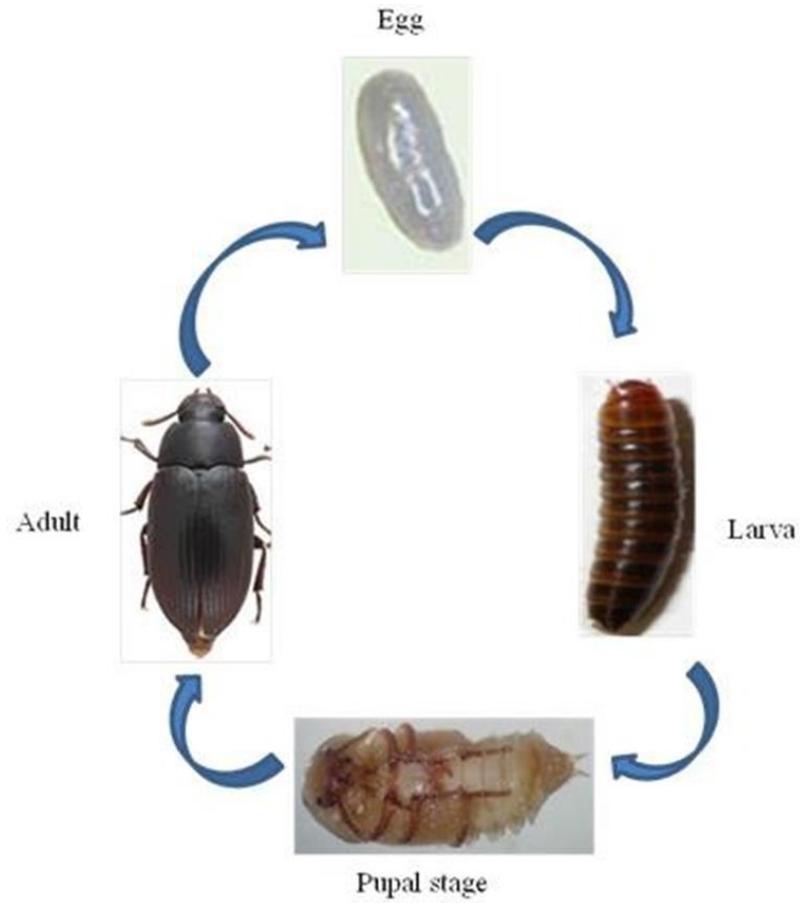


Figure 2 Alphitobius diaperinus egg

[Click here to download Figure OVOS A. DIAPERINUS.pptx](#)

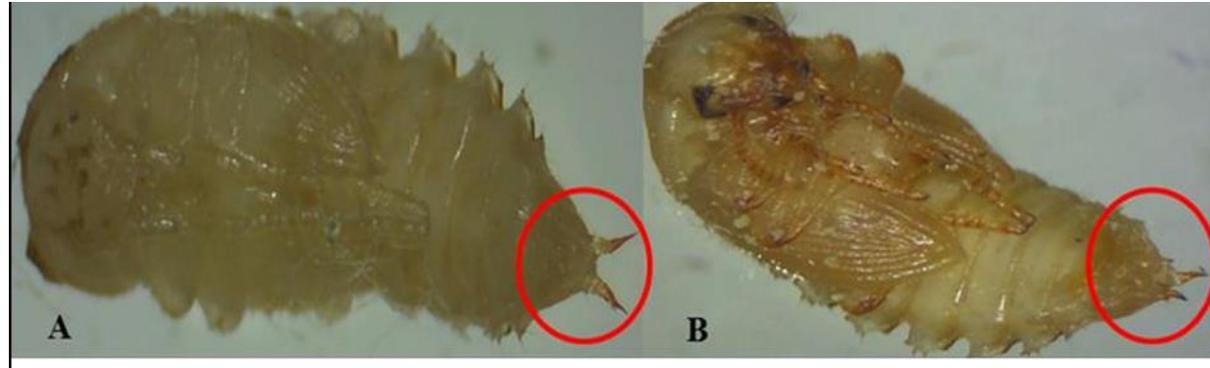


Figure 3 Different instars of *Alphitobius diaperinus*

[Click here to download Figure Figure 3 Different instars of *Alphitobius diaperinus*.pptx](#)



Figure 4 Sexual dimorphism in *Alphitobius diaperinus* pupae: A - male; B - female.



**CAPÍTULO II. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS
PARA O CONTROLE DE *Alphitobius diaperinus* (COLEOPTERA) NA AVICULTURA.**

Artigo de pesquisa original foi submetido à revista *Pest Management Science*, ISSN: 1526-4998, Qualis B1 na área Biotecnologia.

Uso da ecologia química para o controle de *Alphitobius diaperinus*
(Coleoptera:Tenebrionidae) na avicultura.

Janeilda Costa Vaz,^{ac*} Henrique F Goulart,^b Ana PO da Silva,^a Merybeth F Triana,^a
Nadia S J Serra,^a Cenira M de Carvalho^a and Antônio EG Santana^b

* Correspondence to: Janeilda Costa Vaz, Federal University of Alagoas (UFAL), Chemistry and Biotechnology Institute, Av. Lourival Melo Mota, s/n, postcode 57072-900, Maceió, Alagoas State, Brazil. E-mail: janeilda@hotmail.com

a Federal University of Alagoas, Chemistry and Biotechnology Institute, Maceió - AL, Brazil.

b Federal University of Alagoas, Agricultural Sciences Center, Rio Largo - AL, Brazil.

c Federal Institute of Education, Science and Technology of Pernambuco – Barreiros- PE, Brazil.

E-mail addresses:

Henrique F Goulart: fonsecagoulart@gmail.com

Ana PO da Silva: anapaulaoliveira@iqb.ufal.br

Merybeth F Triana: mfernandezt@unal.edu.co

Nadia Stefania J Serra: nadiajelvez@googlemail.com

Cenira M de Carvalho: ceniramc@gmail.com

Antonio EG Santana: aegs@qui.ufal.br

Abstract

BACKGROUND: O *Alphitobius diaperinus* é uma praga de difícil controle e que causa grandes prejuízos à avicultura e a grãos armazenados. Esse inseto é considerado um vetor de vários patógenos e sua presença afeta a saúde e o desenvolvimento das aves.

RESULTADOS: Os extratos da aeração das aves, do ambiente de frangos de corte (cama aviária), da ração e dos componentes da ração foram atraentes para os adultos de *A. diaperinus*, em bioensaios com olfatômetro de vidro tubo em Y. Quatro compostos foram ativos para *A. diaperinus*: Nonanal, 4-ethylbenzaldeido, 4-ethylacetofenona e geranilacetona, testados em solução (na concentração de 1, 10 e 100 ppm). O *Alphitobius diaperinus* mostrou resposta significativa, de forma atrativa, ao nonanal, 4-ethylbenzaldeido e 4-ethylacetofenona e de repelência para a geranilacetona. Três compostos demonstraram atividade atraente quando testados individualmente e 1 composto atividade repelente. Mas quando combinados, as misturas contendo 4-ethylbenzaldeido, 4-ethylacetofenona, nonanal e geranilacetona (mistura 1), 4-ethylbenzaldeido e 4-ethylacetofenona (mistura 2) e o nonanal, 4-ethylbenzaldeido e 4-ethylacetofenona (mistura 3) também apresentaram atividade de atração neste inseto.

CONCLUSÃO: três dos semioquímicos identificados são promissores como atraentes alimentares para *Alphitobius diaperinus* e, podem ser usados em combinação com outras estratégias de controle associadas ao MIP, em torno dos galpões de aves e em ambiente de armazenamento de grãos armazenados.

Palavras chaves: coleópteros; cascudinho; feromônio; cairomônio; milho; soja

1 INTRODUÇÃO

O cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae), é um inseto cosmopolita que causa grande prejuízo à avicultura, é de difícil controle e vetor de diversos patógenos. É considerado como uma das maiores pragas da indústria avícola no Brasil e em diversos países no mundo. Foi considerada, inicialmente, como uma praga secundária de grãos armazenados, mas estes insetos adaptaram-se às condições dos aviários, tornando-se pragas para a avicultura.¹⁻⁴

Esta espécie pode afetar a saúde e desenvolvimento das aves que o ingerem no lugar da ração balanceada e com isso tem sua conversão alimentar reduzida, podendo ainda provocar hemorragias por ferimentos no trato digestivo das aves, além de transmitir vírus, fungos, bactérias, platelmintos, protozoários e outros parasitos.^{5,6}

No Brasil, as formas de controle para as pragas, de maneira geral, são realizadas através de inseticidas químicos de curto período residual, que causa redução populacional temporária e é limitada pela presença constante das aves nos galpões aviários, além da possibilidade de ocasionar o aparecimento de resistência ao inseticida e causar intoxicação aos animais e ao homem. O curto ciclo de vida do inseto e seu comportamento favorecem reinfestações, pois se abriga em fendas, rachaduras, abaixo dos comedouros e abaixo do solo, próximo aos pilares de sustentação dos galpões, tornando-se assim uma praga de difícil controle.⁴⁻⁸

Existem programas de controle biológico de pragas, inclusive para o cascudinho, com o uso de fungos, vírus, bactérias, nematoides e protozoários, com destaque na aplicação de fungos entomopatogênicos. Porém, ainda são inexpressivos os estudos visando à exploração de entomopatógenos como bioinseticidas. Não há muito estudo que enfatize a biodiversidade das espécies e da eficiência dos isolados. Os estudos estão restritos a testes *in vitro* sobre a seleção de isolados dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.⁹ Os nematoides entomopatogênicos como *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* também foram avaliados sobre as larvas e adultos de cascudinhos, verificando-se que as larvas foram mais susceptíveis que os adultos.¹⁰

Estudos têm demonstrado a eficiência de óleos vegetais e extratos de plantas como agentes para o controle de insetos pragas e publicações tem evidenciado a atividade dos óleos essenciais, o que os tornam candidatos a eficientes agentes para o controle de *A. diaperinus*.^{11,12} Outros métodos de controle como a terra diatomácea (TD), um pó inerte composto por carapaças de algas fossilizadas que aderem à epicutícula dos insetos, causam sua morte por desidratação, vem sendo estudado como controle alternativo de *A. diaperinus*.¹³ Apesar dessas possíveis formas de controle, o problema sanitário com o *A. diaperinus* que continua na avicultura causando grandes perdas econômicas e de produção de aves.

Diante deste cenário, os estudos científicos voltados para a identificação de semioquímicos que sejam úteis no controle de pragas vem aumentando. Os semioquímicos são compostos químicos que medeiam à interação entre organismos e que influenciam fortemente o comportamento dos insetos, pois eles usam essas pistas químicas nos processos mais importantes de sua vida: para encontrar alimento, detectar a presença de inimigos naturais, para identificar os melhores locais de oviposição e para mostrar parceiros para reprodução.¹⁴ Devido a todas essas atividades, os semioquímicos são considerados uma ferramenta promissora no controle de pragas em estratégias de manejo integrado¹⁵.

O objetivo deste estudo foi investigar e identificar compostos orgânicos voláteis (COVs), cairomônios, que estejam sendo liberados pelas aves e/ou cama aviária (ambiente), ração e componentes da ração, causando a atração dos insetos para o galpão de criação de aves, a fim de promover a prospecção de compostos naturais com potencial de aplicação como atraentes alimentares para uso no gerenciamento integrado desta praga em aviários.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos Insetos

Os espécimes de cascudinhos foram coletados em camas de frangos de corte em galpões avícolas comerciais, em uma propriedade particular, no município de Maceió, Alagoas-Brasil, cuja latitude é de 9°39'57"S e longitude 35°44'6"O. Os insetos foram encaminhados para o Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais do Centro de Ciências Agrárias-CECA, da Universidade Federal de Alagoas.

No laboratório realizou-se a limpeza mecânica das amostras, para eliminação de material inerte, como penas, fezes e ração, além de outros insetos e também com o objetivo de separar o cascudinho adulto das larvas. A colônia de insetos foi mantida em caixas plásticas, contendo ração de frango farelada e algodão, e acondicionadas em câmara com temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 (L:D). O algodão foi utilizado para servir de abrigo aos insetos, facilitando a postura dos ovos e o desenvolvimento das pupas.

2.2 Tubos coletores de COVs

Para coleta de voláteis nas aves e na cama aviária foram utilizados tubos coletores de vidro (pipeta de Pasteur), contendo 100 mg de Porapak Q[®] (80/100 mesh, 50mg, Supelco USA) e lã de vidro nas duas extremidades. Após a composição do tubo coletor (trap), o material foi levado a um forno a 130°C , com fluxo de ar de $200 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, por duas horas, para ativar o adsorvente antes do uso.

2.2.1 Coleta dos Compostos voláteis nas aves e cama aviária (ambiente)

A coleta dos voláteis foi realizada em grupos de animais, em um mesmo galpão, com aves de 01, 20 e 40 dias de vida, e da cama aviária (ambiente) em uma propriedade particular, situada no município de Maceió. Na propriedade, os animais eram alimentados com ração comercial à base de milho, soja e farinha de carne.

Os compostos voláteis liberados pelas aves e pela cama foram coletados no período da manhã entre 08:00 às 12:00 horas. Para obtenção dos voláteis liberados dos animais e da cama aviária, foi utilizado uma maleta coletora de voláteis e um tubo coletor, utilizando o adsorvente Porapak Q® (80/100 mesh, 50 mg, Supelco), o qual foi acoplado a uma extremidade de uma mangueira de silicone e, a outra extremidade, a uma bomba de sucção na maleta¹⁶. O tubo coletor foi colocado próximo à parte dorsal dos animais, com um fluxo de ar de 800 mL.min⁻¹ por cada grupo animal, para arrastar os odores das aves.

A aeração teve duração de 4 horas para cada grupo animal, contendo 100 aves (01, 20 e 40 dias de vida), e para a cama aviária (ambiente), sendo que para cada grupo (animais e cama aviária) foram colocados quatro tubos coletores (repetições). Após o tempo determinado, os tubos foram recolhidos, embalados com papel alumínio, um a um, e levados ao laboratório para a preparação do extrato (dessorção).

2.2.2 Dessorção em laboratório do material coletado nos animais e cama aviária.

A dessorção das amostras foi realizada com o uso de 0,6 mL de hexano, grau HPLC bidestilado, acondicionados em frascos de vidro de 1,5mL e armazenados a -20 °C até o momento da análise.

2.3 Coleta dos Compostos voláteis (COVs) da ração e da cama aviária

As coletas dos compostos voláteis da ração, dos componentes individuais da ração e da cama aviária foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais da Universidade Federal de Alagoas, por um período de vinte e quatro horas (24 h), segundo o protocolo utilizado por Carvalho (2012).

2.3.1 Aeração da ração e de seus componentes

Os compostos orgânicos voláteis foram obtidos a partir da aeração da ração composta (mistura de milho, soja e farinha de carne) e desses componentes separados, utilizando o tubo coletor de voláteis.

As amostras da ração (10 g) foram colocadas em três coletores de vidro, tipo erlenmeyer (100 mL), contendo duas aberturas (uma na parte superior e outra na parte inferior do vidro), para a circulação do ar. Passou-se pela amostra ar limpo, obtido pela filtração em coluna de carvão ativado (Aldrich – granulometria 20-40 mesh) previamente ativado, a um fluxo de 1000 mL.min⁻¹. Após 24 horas o trap de porapak foi dessorvido em hexano grau HPLC (0,6 mL), os extratos foram acondicionados e armazenados em refrigerador ou freezer (-20 °C) até o momento de uso. As amostras foram obtidas em triplicatas.

2.3.2 Aeração da ração com os insetos

Foram realizadas aerações da ração com insetos adultos e somente da ração por um período de vinte e quatro horas e em triplicata. As amostras da ração mais os insetos foram colocados em frascos coletores de vidro (100 ml), do tipo erlenmeyer (10 g de ração+100 insetos).

Após esse período, os compostos orgânicos voláteis foram dessorvidos com hexano grau HPLC bidestilado (0,6 mL) e as soluções obtidas foram armazenadas em frascos de vidro de 1,5mL e mantidas sob refrigeração (-20°C) até o momento do uso.

2.3.3 Aeração do material da cama aviária realizada no laboratório

Foram realizadas aerações da cama aviária (bagaço de cana), durante 24 horas, sendo duas aerações antes da chegada dos animais e, duas após a saída do lote de animais, no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais do Centro de Ciências Agrárias-CECA da Universidade Federal de Alagoas. As amostras foram colocadas em frascos coletores de vidro (100 ml), do tipo erlenmeyer (10 g da cama aviária).

2.4 Bioensaios em olfatômetro

O olfatômetro utilizado foi constituído de um tubo de vidro em “Y” (com um braço principal de 20 cm de comprimento e dois braços laterais de 15 cm, com 1,5 cm de diâmetro em cada abertura; ângulo de 45°). O arraste de odores no olfatômetro foi provocado pelo ar comprimido obtido de um compressor. Este ar purificado pela passagem por um filtro de carvão ativado. Este modelo de olfatômetro de duas vias é similar ao utilizado em testes olfativos com outros insetos.^{17,18}

Foi avaliada a resposta comportamental do *A. diaperinus* aos voláteis das aves, do ambiente (cama aviária), da ração e de seus componentes individuais. Os bioensaios foram

realizados em uma sala escura com temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa do ar em torno de 50%. O tubo em Y foi colocado em uma caixa branca, contendo uma lâmpada LED vermelha na parte superior. Para cada teste foram utilizados 30 insetos adultos.

Cada extrato testado (estímulo olfativo) foi introduzido no sistema em apenas um dos braços do tubo em Y, enquanto o outro braço servia como controle. Foi aplicado 10µL de cada extrato e de n-hexano, grau HPLC, recém bidestilado, em tiras de papel filtro (controle). O ar introduzido no olfatômetro foi previamente filtrado com carvão ativado e bombeado para dentro do sistema a um fluxo de 400 mL.min⁻¹ em cada braço, ao mesmo tempo em que foi bombeado para fora do olfatômetro através de abertura central na face longitudinal do tubo em Y. Em cada bioensaio foi utilizado um novo inseto e uma nova fonte de estímulo (amostra). O inseto era introduzido no centro do olfatômetro e sua posição registrada durante 10 minutos, o primeiro minuto foi considerado como tempo de reconhecimento do inseto ao ambiente em estudo. Foi registrado o número de entradas e o tempo que o inseto permaneceu em cada braço.

2.5 Cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia GC-EAG

Para as análises por CG-EAG, cabeças juntamente com as antenas de adultos do *A. diaperinus* foram excisadas e aderidas com gel condutor (signa gel, Parker) a dois eletrodos de platina. A extremidade apical da antena foi conectada ao eletrodo de trabalho e a base da antena ao eletrodo de referência. Na parte apical da antena é onde se encontra a maior parte das células receptoras de semioquímicos.

Em seguida, foram injetados 4µL da amostra no CG Shimadzu, modelo 2010, operado no modo “splitless” (250°C), com detector de ionização em chama (DIC) e coluna capilar marca Restek, modelo RTX-5 (30m x 0,25mm D.I. x 0,25µm de espessura do filme), de acordo com a seguinte programação: temperatura inicial de 50°C durante 5min, com aumento de 8°C min⁻¹ até atingir 220°C, temperatura esta mantida por 5 minutos. O hidrogênio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1,31mL.s⁻¹. As respostas da antena, medidas pela diferença de potencial gerada entre os eletrodos, foram amplificadas e esses sinais foram registrados e analisados com auxílio de software (Syntech, Hilversum, The Netherlands).

Os sinais elétricos foram amplificados em um amplificador de alta impedância (IDA-4, Syntech Hilversum, Holanda) e analisados utilizando o programa Syntech GC-EAD32 versão 4.6, 2008. Os compostos que eluíram do cromatógrafo foram considerados ativos se apresentassem atividade eletroantenográfica em duas ou mais séries. Foram realizadas no mínimo oito repetições da mesma amostra. Após obtenção dos resultados, as respostas eletrofisiológicas das antenas foram cuidadosamente analisadas e comparadas entre si, com o objetivo de selecionar os picos de compostos que elicitaram resposta na antena para sua

posterior identificação com auxílio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

2.6 Análises por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Os extratos foram analisados por CG-EM em um cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massas da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 Ultra. A cromatografia foi realizada em coluna capilar RTX-5 (30m x 0,25mm d.i. x 0,25 µm Restetek®). A temperatura do forno foi mantida à 50 °C por 5 minutos, com velocidade de aquecimento de 10 °C/min até 160 °C e, posteriormente, 6 °C/min até 250 °C, mantendo a última temperatura por 10 minutos.

O hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1.79 mL/min. A injeção de 1µL dos extratos foi feita no modo splitless à 250 °C e a detecção nesta mesma temperatura. O espectrômetro de massas operou no modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV) com modo de varredura entre 35 a 400 m/z. A fonte de íons se manteve constante a 200 °C e a interface a 250 °C.

As análises dos cromatogramas e cromatogramas de íons totais (TIC) foram realizadas com o programa CGsolution e CGMSsolution. Os compostos com atividade detectada nas análises por CG-EAG foram identificados pelo cálculo do índice de Kovats e pela análise dos espectros de massas e seu estudo comparativo com dados da biblioteca NIST08 (*National Institute of Standards and Technology*), analisando informações disponíveis na literatura e banco de dados disponível em <pherobase.com> e em <pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Para calcular o índice de Kovats foi realizada injeção de uma série homóloga de *n*-alcanos (Sigma-Aldrich C7-C30) sob as mesmas condições cromatográficas aplicadas aos extratos. Para cada composto relatado, foi analisado o espectro de massas e calculado o índice de Kovats (IK).

2.7 Compostos Sintéticos

Os padrões dos compostos nonanal (98% puro), 4-etilbenzaldeído (98%), 4-etilacetofenona (96%) e geranilacetona (97%, com 35% de Nerilacetona) foram adquiridos de Sigma-Aldrich (Brazil). Foram testados em três (03) concentrações cada (01, 10 e 100 ppm).

2.8 Análise Estatística

As análises de comportamento dos insetos foram submetidos ao teste do Qui-quadrado, com nível de significância de 1%. Os cálculos foram realizados através da fórmula de forma manual:

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e]$$

em que:

- ✓ o = frequência observada para cada classe,
- ✓ e = frequência esperada para aquela classe.

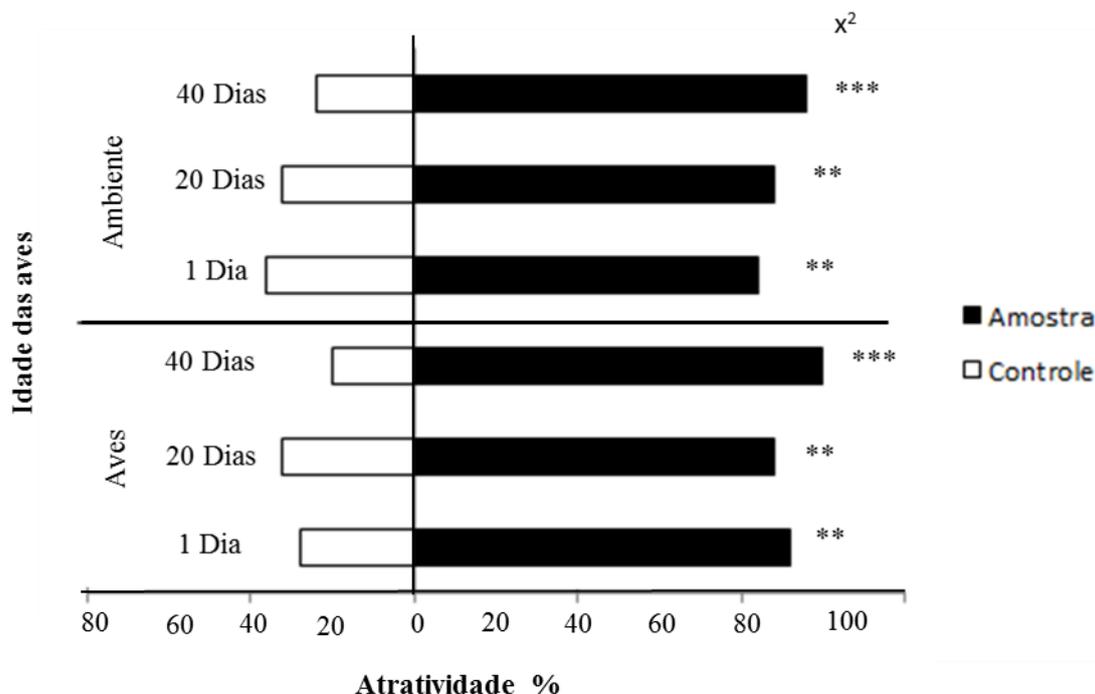
3 RESULTADOS

3.1 Bioensaio de comportamento em olfatômetro em Y

3.1.1 Respostas comportamentais do *Alphitobius diaperinus* aos extratos de aeração das aves.

Os insetos adultos de *A. diaperinus* passaram significativamente mais tempo no braço do olfatômetro que continha o tratamento, exibindo comportamentos como movimentos lentos em conjunto com movimentos nas antenas.

A figura 01 mostra que os resultados dos bioensaios de comportamento foram significativos para os extratos de aeração das aves e do ambiente das aves (cama aviária) com 1, 20 e 40 dias de vida em relação ao controle (hexano). Mas os extratos das aves e do ambiente de aves com 40 dias, foram mais atraentes para *A. diaperinus* do que os demais extratos.

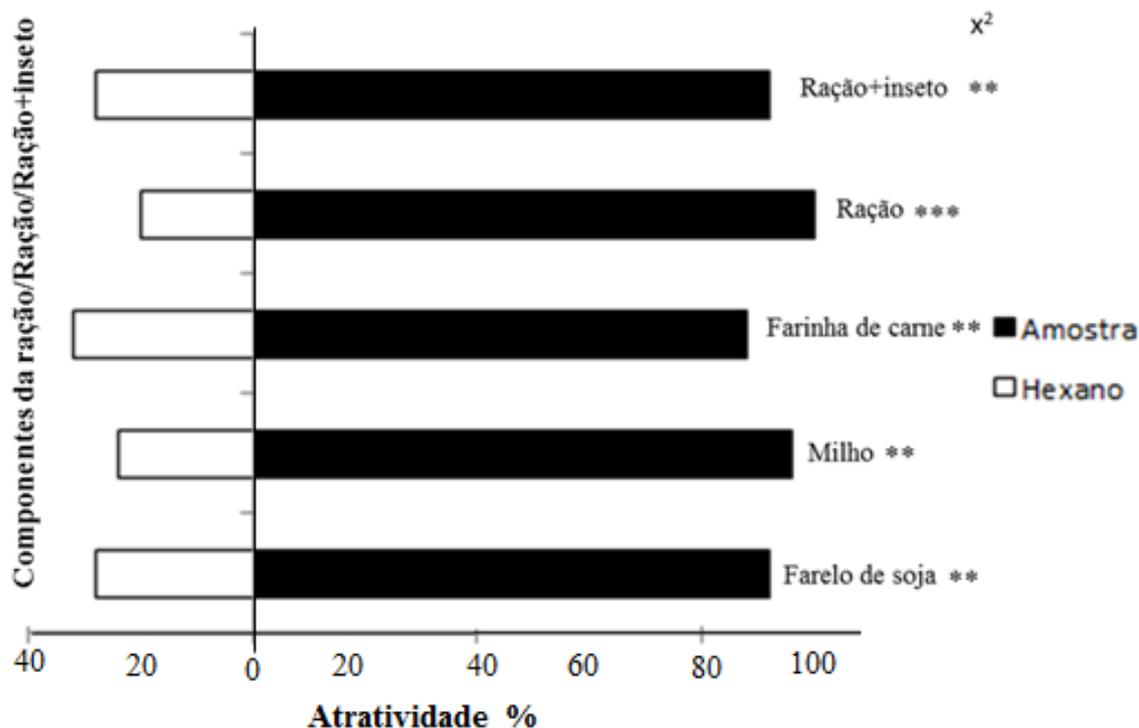


Significância: ** (P<0,01); *** (P<0,001);

Figura 01 Resposta comportamental de *Alphitobius diaperinus* ao extrato por aeração das aves e do ambiente com 01, 20 e 40 dias de vida.

3.1.2 Respostas comportamentais do *Alphitobius diaperinus* aos extratos de aeração da ração, dos componentes da ração (soja, milho e farinha de carne) e da ração com os insetos.

Os resultados dos bioensaios da ração composta, dos componentes da ração (milho, farelo de soja e farinha de carne) e da ração mais os insetos, foram observadas diferenças significativas em relação ao controle (Figura 02). Os extratos da ração foram mais atraentes para o *A. diaperinus* do que os extratos dos componentes individuais da ração.



Significância: ** (P<0,01); *** (P<0,001);

Figura 02 Resposta comportamental de *Alphitobius diaperinus* ao extrato por aeração da ração composta, dos componentes individuais da ração e da ração composta mais os insetos.

3.2 Análises por CG-EAG

As análises realizadas pelo GC-EAG mostraram 4 diferentes compostos ativos nas amostras dos extratos das aves e ambiente das aves, que eliciaram atividade nas antenas do *A. diaperinus*. Os picos CG-EAG ativos foram identificados como: Nonanal, 4-etilbenzaldeído, 4-etilacetofenona e geranilacetona (Tabela 1).

3.3 Análises por CG-EM

A identificação dos compostos foi realizada a partir da análise dos tempos de retenção, índices de Kovats e análise dos espectros de massas, comparação com base de dados NIST08 e Wiley 275L, bem como sua comparação com dados da literatura e comparação com padrões sintéticos (Tabela 1).

Tabela 01 Compostos bioativos por aeração de aves com 1, 20 e 40 dias de vida, selecionados a partir das respostas registradas por CG-EAG e identificação por CG-EM.

Nº	CG-EM Composto	Classe de compostos	1 Dia		20 Dias		40 Dias	
			IK	IK/Lit	IK	IK/ Lit	IK	IK/Lit
1	Nonanal	Aldeído alifático	1102	1103	1102	1103	1102	1103
2	4-Etilbenzaldeido	Aldeído aromático	1167	1168	1167	1168	1167	1168
3	4 Etil acetofenona	Cetona aromática	ND	ND	1278	1281	1278	1281
4	Geranilacetona ou Nerilacetona	Terpeno alifático	ND	ND	1449	1452	1449	1452

Compostos identificados com base na correspondência de tempo de retenção e espectro de massa com padrões genuínos. IK, Índice de Kovats, baseado em tempos de retenção de compostos identificados calculados a partir de alcanos de cadeia linear (C7-C30). IK/Lit, Índice de Kovats da literatura (NIST). ND: composto não detectado na amostra.

As antenas de adultos de *A. diaperinus* responderam a dois compostos, presentes nos extratos de aves com um dia de vida, e a quatro compostos com vinte e quarenta dias de vida (Figuras 3, 4 e 5):

Os números de 1 e 2 indicam a correspondência entre o composto químico da amostra detectado no CG-DIC e a resposta da antena captada no EAG.

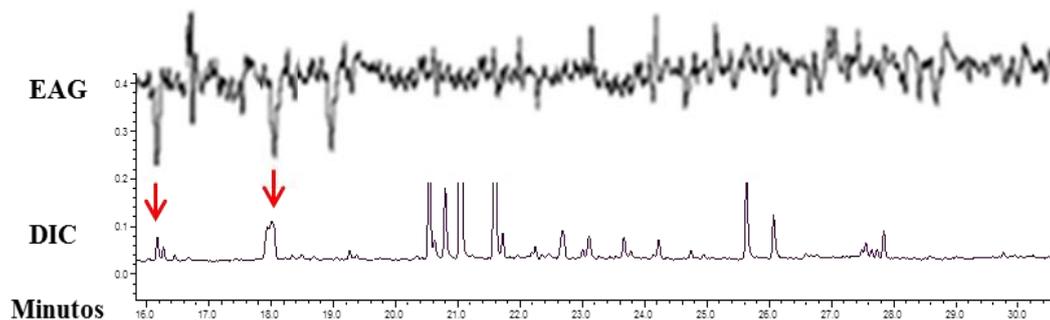


Figura 03 Perfil da resposta eletroantenográfica de adultos de *Alphitobius diaperinus* ao extrato por aeração de aves com 1 dia de vida.

Os números de 1 a 4 indicam a correspondência entre o composto químico da amostra detectado no CG-DIC e a resposta da antena captada no EAG.

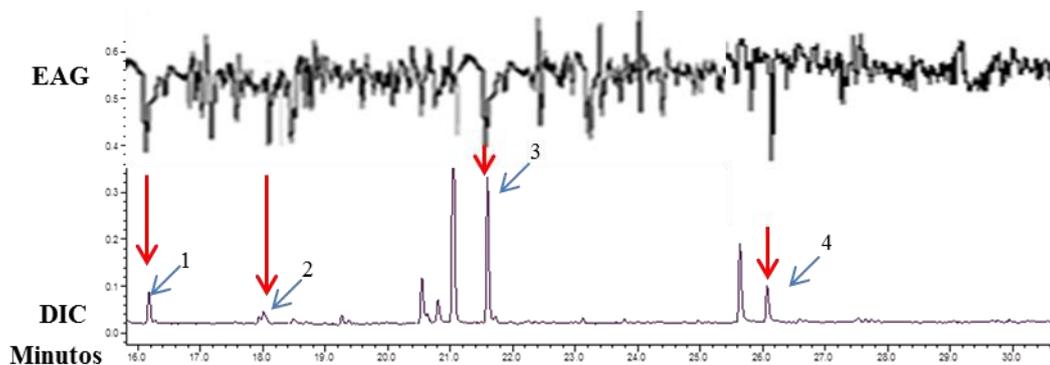


Figura 04 Perfil da resposta eletroantenográfica de adultos de *Alphitobius diaperinus* ao extrato por aeração de aves com 20 dias de vida.

Os números de 1 a 4 indicam a correspondência entre o composto químico da amostra detectado no CG-DIC e a resposta da antena captada no EAG.

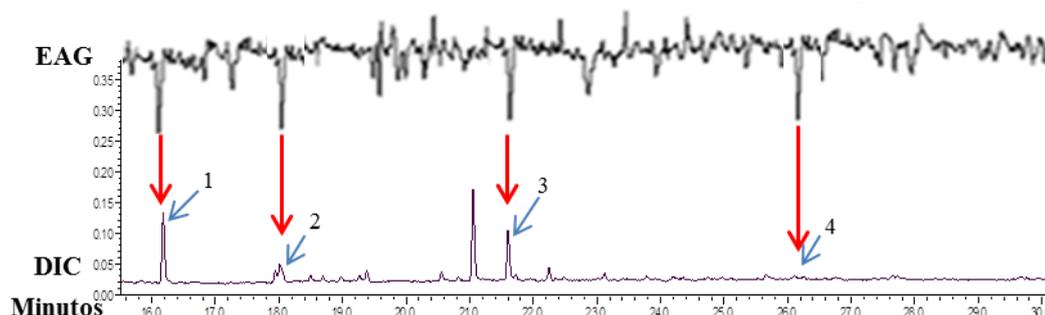


Figura 05 Perfil da resposta eletroantenográfica de adultos de *Alphitobius diaperinus* ao extrato por aeração de aves com 40 dias de vida.

A análise do CG-EM revelou dois compostos como indicado na tabela 02 para ambiente de aves com um, vinte e quarenta dias de vida.

Tabela 02 Compostos eletrofisiologicamente ativos identificados em extratos de aeração do ambiente das aves (cama aviária).

Nº	CG-MS Composto	Classe Química	1 Dia		20 Dias		40 Dias	
			IK	IK/Lit	IK	IK/ Lit	IK	IK/Lit
1	4-Etilbenzaldeido	Aldeído aromático	1163	1163	ND	ND	1186	1181
2	4- Etilacetofenona	Cetona aromática	1270	1273	1269	1269/1273	ND	ND

Compostos identificados com base na correspondência de tempo de retenção e espectro de massa com padrões genuínos. IK, Índice de Kovats, baseado em tempos de retenção de compostos identificados calculados a partir de alcanos de cadeia linear (C7-C30). IK/Lit, Índice de Kovats da literatura (NIST). ND: composto não detectado na amostra

3.4 Compostos orgânicos voláteis identificados por CG/EM em amostras da ração

Os resultados das análises por CG-EM estão compilados na Tabela 3. Foram identificados 14 compostos presentes na ração.

Tabela 03 Composição química da ração composta

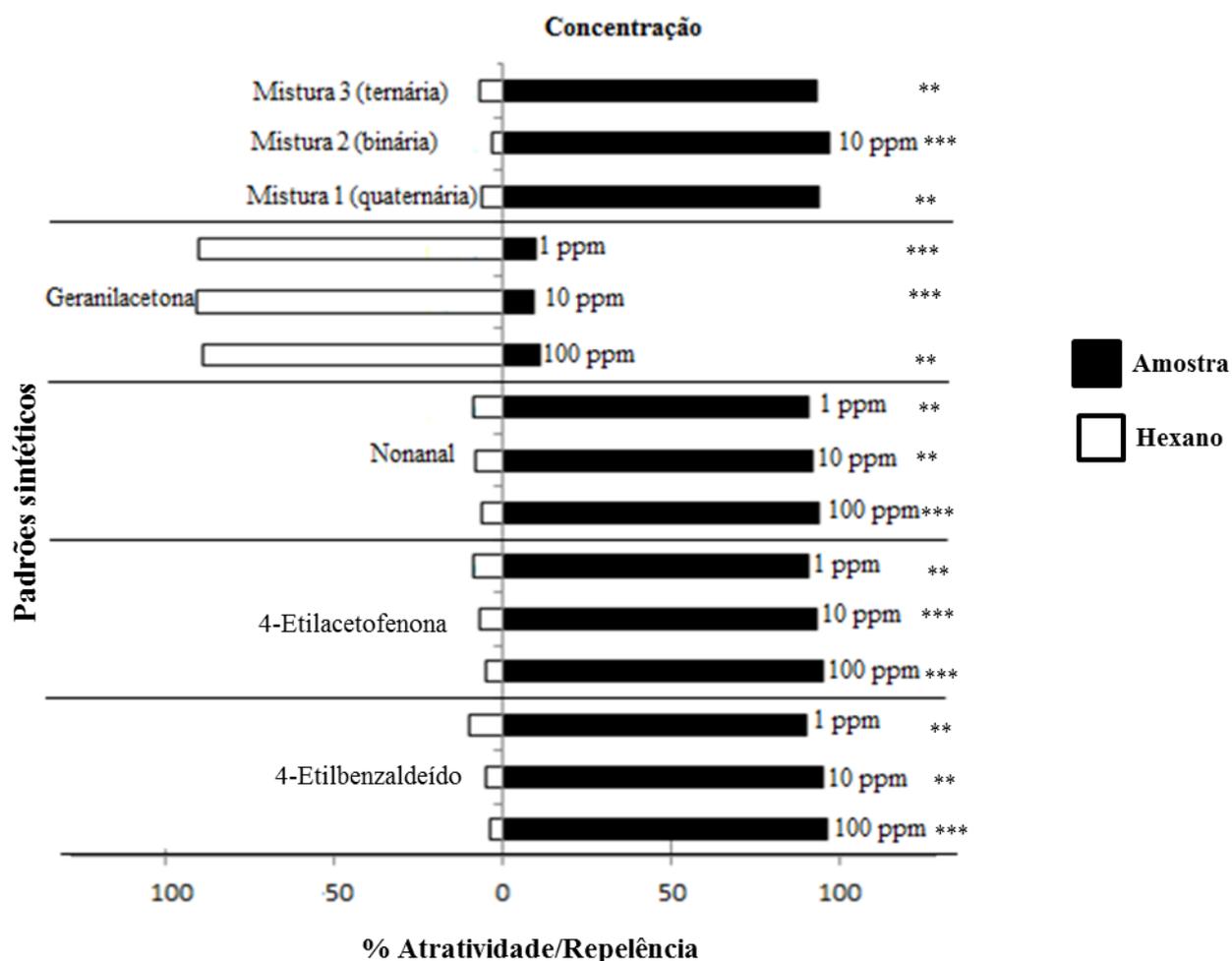
Composto	TR	IK	Área do pico
3-Hexanol	5238	799	0.43
2-Hexanol	5391	803	1,09
Heptano, 2,4-dimetil-	6268	826	2.26
6-Metil-5-hepteno-2-um	12134	984	0.31
Octano, 5-etil-2-metil- (CAS)	14986	1066	1.57
1-Undeceno, 7-metil-	15510	1081	0.70
Acido acético	15648	1085	0.27
Nonanal *	16180	1100	1.46
4-Etilbenzaldeído **	18484	1173	3,23
2-Propenal	18572	1176	0.12
Naftaleno	18688	1180	0.40
3-Etilacetofenona	19265	1198	0.13
4-Etilacetofenona ***	21050	1259	13,12
Geranilacetona ****	26246	1449	0.35

*composto presente na farinha de carne e no milho; **composto presente na soja e milho; *** /****compostos presentes na soja.

3.5 Respostas comportamentais de *Alphitobius diaperinus* aos compostos sintéticos

Foram identificados quatro compostos ativos no extrato e os padrões sintéticos destes quatro compostos foram testados em três concentrações (01, 10 e 100 ppm). Os compostos sintéticos foram testados em bioensaios com olfactômetro de vidro tubo em Y, em concentrações próximas às encontradas nos extratos, obtidos por aeração. Todos foram significativamente atraentes (nonanal, 4-etilbenzaldeído e 4-etilacetofenona) ($P < 0,001$), exceto a geranilacetona, que se mostrou repelente nas três concentrações ($P < 0,001$).

No entanto, quando os compostos sintéticos foram misturados a uma concentração de 10 ppm (cada composto na mistura) e testados juntos, a resposta do *A. diaperinus* foi significativamente atraente ($P < 0,001$). Foram testadas três misturas, a mistura 1, mistura quaternária, composta pelo nonanal, 4-etilbenzaldeído, 4-etilacetofenona e geranilacetona. A mistura 2, mistura binária, composta pelo 4-etilbenzaldeído e 4-etilacetofenona e a mistura 3, mistura terciária, composta pelo nonanal, 4-etilbenzaldeído, 4-etilacetofenona. O *A. diaperinus* apresentou resposta significativa as três misturas, demonstrando maior atratividade pela mistura 2 ($P < 0,01$; $P < 0,001$ respectivamente)(Figura 06).



Significância: ** (P<0,01); *** (P<0,001)

Figura 06 Resultados das respostas comportamentais de *Alphitobius diaperinus* aos compostos sintéticos.

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos bioensaios mostraram que os voláteis liberados pelas aves, por aeração, foram significativamente atrativos para *A. diaperinus*, os dados foram submetidos ao teste do Qui-quadrado a 1% de significância. Até o momento não há relatos de respostas comportamentais dessa espécie estudada, com extratos obtidos da aeração, realizadas diretamente nas aves. Estudos deste tipo relataram as respostas comportamentais com extratos oriundos de aerações realizadas em bovinos, equinos e ovinos.^{16,19, 20}

As análises por CG-EAG foram com extratos obtidos por aeração das aves de 01, 20 e 40 dias de vida, estes extratos possuem dois compostos ativos no CG/EAG que se repetem em todos os extratos, o nonanal e o 4-Etilbenzaldeído, capazes de estimular o *A. diaperinus*, diferindo dos demais compostos. Do extrato por aeração das aves, foram observadas compostos

ativos pertencentes a diferentes classes: aldeído alifático (nonanal), aldeído aromático (4-etilbenzaldeído), cetona aromática (4-etilacetofenona) e terpeno (geranilacetona e/ou nerilacetona, que foram confirmados, por comparação com amostra padrão.

O Nonanal foi encontrado em todas as amostras de aeração das aves e nas diferentes idades, sendo ativo nas análises de CG/EAG com o *A.diaperinus*. Esse composto já foi descrito como atraente e repelente em várias espécies de coleópteros²¹⁻²³ e lepidópteros.²⁴⁻²⁷

O nonanal também já foi descrito como atraente e repelente em formulações de armadilhas para coleópteros, a exemplo de repelência para *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Cucujidae) e *O.mercator* (Coleoptera: Cucujidae), pragas secundárias de grãos armazenados.²⁸ Nonanal é um aldeído, encontrado em pelo menos 20 óleos essenciais, incluindo óleos de citrinos e o óleo de várias espécies de pinheiro. Também é utilizado em perfumaria, e como agente aromatizante.

De Groot et al.²¹ relataram que o *Hylastes opacus*, uma praga de coníferas, usa voláteis para procurar material hospedeiro adequado para alimentação e criação de ninhadas, é fortemente atraído por esse composto em armadilhas. Adhikary et al.²³ constataram que o nonanal testado em armadilhas também foi atraente para a *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae), uma praga de grãos armazenados, a *Lathyrus sativus* L. (Leguminosae), uma leguminosa muito utilizada na China.

Estudos realizados por Casado et al.²⁵ mostraram que o nonanal induziu uma resposta antenal em machos e fêmeas da *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae), uma mariposa praga da maçã. Derksen et al.²⁶ relataram que 21 compostos, dentre eles, o nonanal, induziu respostas antenais de macho e fêmea *Synanthedon exitiosa* (Lepidoptera: Sesiidae), praga que ataca pessegueiros e cerejeiras.

Esse composto também já foi utilizado como atraente em formulações para mosquito do gênero *Aedes* (Diptera: Culicidae). Testes com o nonanal foram realizados para avaliar o comportamento de oviposição das fêmeas do *A. aegypti*, os pesquisadores relataram que esse composto causou atração das fêmeas desse mosquito para a oviposição.²⁴ Diferente do que foi relatado com relação ao nonanal presente na pele de seres humanos, com repelência dos mosquitos *A. aegypti*.²⁷ Alguns estudos apontam a diferença de composição da microbiota da pele do ser humano como principal fator responsável pela variação interindividual da atratividade para os mosquitos, uma vez que a maioria dos odores gerados pelo organismo do ser humano é produzida a partir do metabolismo dessas bactérias.

Dessa maneira, pode-se afirmar que determinadas pessoas que são menos atrativas para os mosquitos, possuem bactérias produtoras de compostos que podem ser considerados como repelentes naturais.²⁹ A geranilacetona junto com o nonanal e outros compostos é encontrado em maiores quantidades em pessoas menos atrativas para *A. aegypti*, porém não se sabe ao certo

se eles atuam como repelentes naturais do ser humano ou se apenas mascaram os principais estímulos atrativos²⁷.

Geranilacetona é um composto presente na composição dos voláteis de óleos essenciais de várias plantas. Fonseca et al.³⁰ relataram que a geranilacetona está presente também na composição dos voláteis das folhas e dos ramos da erva-mate obtidos através da aeração, e que nos testes de olfatômetro, esse composto atraiu significativamente as fêmeas de *Hedypathes betulinus* (Coleoptera: Cerambycidae), uma praga da referida cultura. Esse efeito pode ser causado pela geranilacetona presente nos voláteis da planta hospedeira. Diante disso, foi levantada a hipótese que o macho de *H. betulinus* pode estar sequestrando a geranilacetona presente na planta hospedeira e usando-a como precursora do feromônio. A produção do feromônio dos machos de *H. betulinus* foi dependente da presença da planta hospedeira. Na presença de ramos da erva-mate os machos liberaram significativamente mais voláteis que os machos na ausência da planta. Esse resultado suporta a hipótese de que os machos sequestram a geranilacetona presente na planta hospedeira durante a alimentação e a usam como precursora para a produção do feromônio. Esses compostos também são obtidos pela clivagem de carotenoides por enzimas oxidativas.³¹

Já os resultados obtidos nos bioensaios com extratos do ambiente das aves, mostram que os voláteis liberados pela cama aviária, obtidos por aeração, foram significativamente atrativos para *A. diaperinus*, os dados foram submetidos ao teste do Qui-quadrado a 1% de significância.

Nas análises por CG-EAG foram realizadas com extratos por aeração do ambiente das aves com 01, 20 e 40 dias de vida, dois compostos foram identificados no ambiente de aves com um dia de vida, o 4-Etilbenzaldeído (aldeído aromático) e o 4-etilacetofenona (cetona aromática), diferindo dos extratos do ambiente com vinte e quarenta dias de vida. No ambiente de aves com vinte dias, foi identificado o 4-Etilacetofenona e nos extratos do ambiente com aves com quarenta dias de vida.

A resposta comportamental de *A. diaperinus* à mistura sintética de 4 componentes, que foram identificados como compostos ativos o nonanal, 4-etilbenzaldeído, 4-etilacetofenona geranilacetona, em concentrações semelhantes às encontradas nas amostras, foi consideravelmente mais forte do que o observado para os mesmos compostos, quando testados isoladamente. O mesmo aconteceu com a mistura de dois compostos sintéticos 4-etilbenzaldeído e 4-etilacetofenona. Comprovando que a mistura dos compostos é mais eficaz do que o uso individual dos mesmos compostos ativos. Vários estudos chegaram à conclusão de que os insetos usaram mais de um semioquímico na busca de recursos.³²⁻³⁵

As análises do CG-DIC e CG-EM dos extratos de aeração do ambiente de aves, mostraram diferenças entre os perfis dos voláteis liberados pelos extratos nas três idades das

aves estudadas. No entanto, todos os compostos identificados nos extratos do ambiente das aves, também foram identificados nos extratos de aeração das aves.

Com relação às análises do CG-DIC e CG-EM dos extratos de aeração da ração composta e dos componentes da ração (farelo de soja, milho e farinha de carne), mostraram que os compostos identificados, são os mesmos compostos encontrados nos extratos de aeração das aves e do ambiente das aves, comprovando que esses compostos podem servir como atrativos alimentares para *A. diaperinus*, o que explica a grande quantidade desses insetos dentro dos galpões avícolas, devido a grande quantidade de ração que é oferecida as aves durante todo o ciclo de vida.

A emissão de COVs por sementes está relacionada às reações de peroxidação lipídica, bem como à fermentação alcoólica e às reações de Maillard que ocorrem durante a maturação das sementes, soja e milho, onde há uma degradação das reservas armazenadas nas células das sementes, como carboidratos e ácidos gordurosos poli-insaturados.³⁶

Estudos mostram que as sementes de diferentes espécies, têm seu próprio perfil de emissões voláteis e que a concentração dos compostos aumenta de acordo com o tempo de armazenamento.³⁶ Este conjunto de voláteis mostra as mudanças fisiológicas das próprias sementes, mas também tem influência nas interações ecológicas complexas entre plantas e animais, no meio ambiente.³⁷

5 CONCLUSÃO

As aves estudadas, liberam COVs que atuam como cairomônios, atraindo os insetos adultos de *A. diaperinus*, com o potencial para utilização no manejo dessa praga como atraentes alimentares em estratégias que visem o monitoramento, o controle por captura massa e/ou atração seguida de morte, ou push pull em conformidade com o MIP. O ambiente das aves, a ração completa e os componentes da ração estudada liberam COVs que atuam como compostos atraentes e um composto repelente para os insetos adultos de *A. diaperinus*. Os compostos sintéticos de forma isolada e suas misturas também eliciaram atração em adultos desta espécie, demonstrando assim, o seu potencial para o desenvolvimento de ferramentas de controle aplicáveis no manejo de *A. diaperinus* dentro e ao redor de galpões avícolas e em ambientes de armazenamento.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Agradecemos ainda ao Dr Sinval Silveira Neto, da ESALQ/USP, pela identificação taxonômica dos insetos.

REFERÊNCIAS

- 1 Mcallister JC, Steelman CD, Newberry LA, Skeeles JK. Isolation of infectious bursal disease virus from the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). **Poultry Science**. v.74.p. 45-49, 1995.
- 2 Camargo Neto AF, Tallarico E, Capriogli MA, Soares VE, Meireles MV, Silva GS. Seasonal Variation of *Alphitobius diaperinus* Population in Broiler Facilities in the Center- North Region of The State of São Paulo. **Brazilian Journal of Poultry Science**, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 183 – 185, 2006.
3. Lambkin, TA. Trialling Biological Agents for the Management of Lesser Mealworm in Australian Broiler Houses. Rural Industries Research and Development Corporation. Publication N. 11/033. Electronically published by RIRDC in April 2011.
4. Chernaki-leffer AM, Sosa-goméz DR, Almeida LM, Lopes ION. Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera, Tenebrionidae) to cypermethrin, dichlorvos and triflumuron in South ern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.55, p.125-128, 2011.
5. Chernaki-leffer AM, Biesdorf SM, Almeida LM, Leffer EVB, Vigne F. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, SP, v. 4, n. 3, p. 243-247, set./dez. 2002.
6. Japp AK, Bicho CL, Silva AVF. Importância e medidas de controle para *Alphitobius diaperinus* em aviários. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 7, jul. 2010.
7. Alves, LFA, Alves VF, Bressan DF, Neves PMOJ, Alves SB. Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em adultos de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) em aviários comerciais em Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**, Londrina, PR, v. 33, n. 6, p. 793-795, nov./dez. 2004.
8. Marques CRG, Mikami AY, Pissinati A, Piva LB, Santos OJAP, Ventura MU. **Mortalidade de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) por óleos de nim e citronela**. Ciências Agrárias, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2565-2574, nov./dez. 2013.
9. Constanski KC, Neves PMOJ, Nogueira LM, Santoro PH, Amaro JT & Zorzetti J. Selection and evaluation of virulence of *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. Submitted to different temperature. **Semina: Ciências Agrárias**. 32(3): 875-882, 2011.
10. Alves LFA et al. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* S. *carpocapse* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.1, p.139-141, 2005.
11. Marcomini AM, Alves LFA, Bonini AK, Mertz NR, Santos JC. Atividade Inseticida de extratos vegetais e do óleo de nim sobre adultos de *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera, Tenebrionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.76, n.3, p.409-416, jul./set., 2009.

12. Szczepanik M, Zawitowska B, Szumny A. Insecticidal activities of *Thymus vulgaris* essential oil and its components (thymol and carvacrol) against larvae of lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae). **Allelopathy Journal** 30: 129–142, 2012.
13. Alves LFA et al. Fatores que Afetam a Efi ciência da Terra de Diatomácea no Controle de Adultos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology* 37(6):716-722 (2008).
14. Cox PD, Collins LE. Factors affecting the behaviour of beetle pests in stored grain, with particular reference to the development of lures. **Journal Stored Prod Res** 38:95-115, 2002.
15. Trematerra P. Advances in the use of pheromones for stored-product protection. **Journal Pest Sci** 84:285-299. doi: 10.1007/s10340-011-0407-9, 2012.
16. Carvalho MC. Comportamento da Mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans*, (Diptera: Muscidae) frente aos Compostos Orgânicos Voláteis de Diferentes Raças Bovinas. 2012. 96 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2012.
17. Weissling TJ, Giblin Davis RM, Gries G, Gries R, Perez AL, Pierce HDJR e Oehlschlager AC. Aggregation pheromone of palmetto weevil, *Rhynchophorus cruentatus* (F.) (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Chemical Ecology**, 20:505 – 515, 1994.
18. Tafoya F, Lopez-collado J, Stanley D, Rojas J C & Cibrian-tovar J. Evidence of an aggregation pheromone in males of *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, 32:484 – 487, 2003.
19. Serra SJS. Identification of chemical attractants for stomoxys calcitrans (Diptera: Muscidae) control and monitoring purposes . Tese de Doutorado, Universidade Federal de Alagoas. Maceió – Al (2016).
20. Rios RRS. Identificação de compostos orgânicos voláteis encontrados na pele de machos ovinos deslanados. 2015. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2015.
21. De groot P, Poland TM. Attraction of *Hylastes opacus* (Coleoptera: Scolytidae) to nonanal. **The Canadian Entomologist** 135: 309 - 3 11, 2003.
22. Fettig CJ et al. **Responses of *Dendroctonus brevicomis* (Coleoptera: Curculionidae) in Behavioral Assays: Implications to Development of a Semiochemical-Based Tool for Tree Protection.** *Journal of Economic Entomology* Vol. 105, no. 1, 2012.
23. Adhikary P, Mukherjee A and Barik a. Attraction of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) to four varieties of *Lathyrus sativus* L. seed volatiles. Ecology Research Laboratory, Department of Zoology, The University of Burdwan, Burdwan – 713 104, West Bengal, India. 2015.
24. Roque RA. Avaliação de atraentes de oviposição, identificados em infusões de capim colômbio (*Panicum maximum*) para fêmeas de *Aedes aegypti* (L. 1762) (Diptera: Culicidae) em condições de semicampo e campo. 2007. 98 f. Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

25. Casado D, Gemeno C, Avilla JA and Riba A. Day-night and phenological variation of apple tree volatiles and electroantennogram responses in *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). **Environ. Entomol.** 35: 258-267, 2006.
26. Derksen S, Chatterton M, Gries R, Aurelian M, Judd G and Gries G. Semiochemical-mediated oviposition behavior by female peachtree borer, *Synanthedonexitiosa*. *Entomol. Exp. Applic.* 123: 101-108, 2007.
27. Logan J G et al. Identification of human-derived volatile chemicals that interfere with attraction of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 3, p. 308–322, 2008.
28. Pierce AM *et al.* Attraction of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) and *Oryzaephilus mercator* (Fauvel) (Coleoptera: Cucujidae) to some common volatiles of food. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, n. 2, p. 465–475, 1990.
29. Verhulst NO et al. **Chemical ecology of interactions between human skin microbiota and mosquitoes.** *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 74, Issue 1, 1 October 2010, Pages 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00908.x>
30. Fonseca MG. **Estudo da ecologia química da broca-da-erva mate, *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae). Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.** <http://hdl.handle.net/1884/23797>
31. Schwab W, Rikanati RD and Lewinsohn E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal* (2008) 54, 712–732. doi:10.1111/j.1365-3113.2008.03446.x
32. Bruce TJA, Martin JL, Smart LE, Pickett JA. Development of semiochemical attractants for monitoring bean seed beetle, *Bruchus rufimanus*. *Pest Manag Sci* **67**:1303–1308 (2011).
33. Ukeh DA, Woodcock CM, Pickett JA, Birkett MA. Identification of host kairomones from maize, *Zea mays*, for the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *J Chem Ecol* **38**:1402–1409 (2012).
34. Mendesil E, Bruce TJA, Woodcock CM, Caulfield JC, Seyoum E, Pickett JA. Semiochemicals used in host location by the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *J Chem Ecol* **35**:944–950 (2009).
35. Liu L, Zhou Q. Olfactory response of female *Bactrocera minax* to chemical components of the preference host citrus volatile oils. *J Asia Pac Entomol* **19**:637–642 (2016).
36. Colville L, Bradley EL, Loyd AS, Pritchard HW, Castle L, Kranner I. Volatile fingerprints of seeds of four species indicate the involvement of alcoholic fermentation, lipid peroxidation, and Maillard reactions in seed deterioration during ageing and desiccation stress. *J Exp Bot* **63**:6519–6530 (2012).
37. Youngsteadt E, Bustios PG, Schal C. Divergent chemical cues elicit seed collecting by ants in an obligate multi-species mutualism in Lowland Amazonia. *PLoS One* **5**:e15822 (2010).

**CAPÍTULO III. ATIVIDADE REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE
Schinus terebinthifolius raddi (ANACARDIACEAE) CONTRA *Alphitobius diaperinus*
(Panzer, 1797) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)**

Artigo de pesquisa original que será submetido à revista *Pest Management Science*, ISSN: 1526-4998, Qualis B1 na área Biotecnologia.

CAPÍTULO III. ATIVIDADE REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius Raddi* (ANACARDIACEAE) CONTRA *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797)(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

RESUMO

Alphitobius diaperinus (Coleoptera: Tenebrionidae) é um inseto cosmopolita, conhecido como cascudinho, é considerada uma praga de grande interesse econômico para a avicultura e de difícil controle. Os produtos naturais extraídos de plantas se têm constituído uma alternativa importante para o controle de pragas, por serem mais seletivos e menos danosos ao meio ambiente como o óleo essencial. A constituição química do óleo essencial dos frutos maduros de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Anacardiaceae) coletados no município de Maceió-AL, Brasil, foi analisada por CG-FID e CG-EM. Foram identificados 14 compostos, equivalentes a 96,13% do óleo, sendo a maioria deles monoterpenos. Os compostos majoritários do óleo foram β -pineno (49,8%), α - pineno (33,49 %), 3-careno (5,85%), germanceno-D (2,08%) e bornileno (1,21%). A bioatividade do óleo essencial foi testada contra a praga da avicultura e de produtos armazenados *A. diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) em bioensaios realizados em olfatômetro em Y. O óleo essencial apresentou forte atividade repelente contra os adultos de *A. diaperinus* nas doses de 1 μ L e 10 μ L, assim como aos testes realizados com o óleo essencial + mistura de padrões sintéticos (nonanal, 4-etilbenzaldeído e 4-etilacetofenona), tendo como controle o hexano. Possíveis relações entre o óleo essencial e sua a atividade repelente são discutidas.

Palavras-chave: Pimenta rosa, óleo essencial, insetos-praga, repelente

ABSTRACT

Alphitobius diaperinus (Coleoptera: Tenebrionidae) is a cosmopolitan insect, known as a small bird, is considered a pest of great economic interest for poultry farming and difficult to control. Natural products extracted from plants have been an important alternative to pest control because they are more selective and less harmful to the environment such as essential oil. The chemical composition of the essential oil of the mature fruits of *Schinus terebinthifolius raddi* (Anacardiaceae) collected in the city of Maceió-AL, Brazil, was analyzed by CGDIC and C-EM. 14 compounds, equivalent to 96.13% of the oil, were identified, most of them monoterpenes. The major compounds of the oil were β -pinene (49.8%), α -pinene (33.49%) and 3-carene (5.85%), 21%). The bioactivity of the essential oil was tested against the pest of poultry and stored products *A. diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) in bioassays in olfactometer in Y. The essential oil showed strong repellent activity against the adults of *A. diaperinus* in doses of 1 μ L and 10 μ L, as well as the tests performed with the essential oil + mixture of synthetic standards (nonanal, 4-ethylbenzaldehyde and 4-ethylacetophenone), with hexane as the control. Possible relations between the chemical constitution of the essential oil and its repellent activity are discussed.

Keywords: Pink pepper, essential oil, pest insects, repellent

1. INTRODUÇÃO

O *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), conhecido como cascudinho, é uma praga secundária de produtos armazenados e também considerada uma praga de grande interesse econômico para a avicultura, por causar sérios problemas na produção avícola (OLTON, 1970); (DESPINS *et al.*, 1991). Essa praga migrou para os aviários, provavelmente, mediante a disponibilidade de alimentos estocados nas fazendas e vizinhas aos aviários. Pode ser encontrado em grandes quantidades nos aviários e causar sérios prejuízos econômicos à atividade avícola (CHERNAKI, 2004).

A infestação do *A. diaperinus* em um sistema intensivo de aves, afeta o desempenho das aves, a saúde animal e humana. É considerado vetor de vários patógenos, que podem causar a perda de peso das aves e até a morte (HILBERT *et al.*, 2012; LEFFER *et al.*, 2010; SKOV *et al.*, 2004). Dentre os agentes patogênicos transmitidos pelo cascudinho, destacam-se as bactérias, vírus, fungos, protozoários e parasitas, que causam grandes problemas sanitários na avicultura (LEFFER *et al.*, 2010; OU; GIAMBRONE; MACKLIN, 2012; HILBERT *et al.*, 2012).

Além de ser uma praga de difícil controle, por conta de suas características comportamentais e biológicas que permitem sua proliferação, uma vez estabelecidos, multiplicam-se rapidamente, sendo encontrados em populações elevadas em cama de frangos de corte, de matrizes, e mesmo em fezes de poedeiras de ovos comerciais confinadas em gaiolas (LEFFER *et al.*, 2010; OU; GIAMBRONE; MACKLIN, 2012).

Existem diversas formas de controle para o *A. diaperinus*, mas a mais utilizada ainda é o controle químico, que está baseado na utilização de inseticidas químicos de curto período residual. A utilização dos inseticidas sintéticos causa redução populacional temporária e é limitada pela presença constante das aves nos aviários. Este método de controle é realizado através de pulverizações com inseticidas a cada saída das aves no final do lote. É aplicado nas paredes, pilares, vigas, travessas e tesouras, muretas, beirais, caixas de ração e piso (CHERNAKI, 2004; HAMM *et al.*, 2008). O sucesso de tal método é relativo, além de causar problemas como desenvolvimento de populações de insetos resistentes, pode causar risco de intoxicação das aves, do produtor e contaminação ambiental, se configurando um fator limitante ao uso desses produtos químicos (ALVES, L F A *et al.*, 2006) ALVES *et al.*, 2006; LAMBKIN, 2011).

Assim, é de grande importância o estudo de métodos alternativos de controle, visando diminuir o uso de inseticidas químicos. Existem trabalhos de pesquisas com inúmeras espécies de plantas na busca de um controle de pragas, eficiente e seguro. Nos últimos anos, a procura de novas plantas com atividade inseticida como possível alternativa ao uso de inseticida químico sintético, tornou-se um ponto de acesso na pesquisa de pesticidas, como os óleos

essenciais presentes em diversas plantas (STEFANAZZI; STADLER; FERRERO, 2011; JIANG *et al.*, 2012). Entre os óleos vegetais testados no controle do *A. diaperinus*, o óleo de nim proveniente da planta indiana *Azadiracthina indica* A. Juss e o óleo de citronela (*Cymbopogon wynterianus* Jowitt) apresentaram efeito de deterrência alimentar, inibidora de crescimento e desenvolvimento de larvas e na mortalidade de adultos de *A. diaperinus* (AZEVEDO *et al.*, 2010; MARQUES *et al.*, 2013).

Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) é uma árvore perene nativa das Américas Central e Sul, conhecida popularmente como aroeira, aroeirinha ou aroeira-da-praia, cujos frutos são muito valorizados como condimento alimentar especialmente na culinária francesa, em que são chamados de poivre rose. A espécie é considerada uma invasora nos países da América do Norte, e seus frutos recebem o nome de pimenta brasileira, Florida holly ou christmas-berry; enquanto no Brasil, a nomenclatura mais utilizada é pimenta-rosa (AZEVEDO, *et al.*, 2015; LORENZI, 2008). Nos últimos anos, em Alagoas, o cultivo da pimenta rosa tem contribuído para o desenvolvimento sócio-ambiental da região da foz do rio São Francisco, no município de Piaçabuçu. Através de parcerias entre empresas públicas, privadas e organizações não governamentais houve o aprimoramento dos processos de coleta e beneficiamento e inserção do produto no mercado sem atravessadores, melhorando a renda de diversas famílias ribeirinhas (EBC, 2012).

Pesquisas têm demonstrado que o óleo essencial (OE) obtido dos frutos de *S. terebinthifolius* possui diversas atividades farmacológicas, como antioxidante, antimicrobiana, antidepressiva, anti-hiperalgésica e anticâncer (BENDAOU *et al.*, 2010; COLE *et al.*, 2014; MATSUO *et al.*, 2011; PICCINELLI *et al.*, 2015; RICHTER *et al.*, 2010) e também é valorizado pela indústria de cosméticos e perfumaria.

No contexto da entomologia agrícola, o OE das folhas de *S. terebinthifolius* demonstrou atividade inseticida contra *Acanthoscelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus*, coleópteros da família Bruchidae, considerados importantes pragas de grãos armazenados (SANTOS *et al.*, 2007). O OE de plantas têm sido descrito como fontes de compostos com atividades de interesse no manejo integrado de pragas (MIP), aplicáveis como repelentes ou inseticidas naturais (YANG *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2015; YOU *et al.*, 2015). É rico em monoterpenos, responsáveis por várias atividades da planta, agem como agente antimicrobiano contra vários tipos de bactérias e fungos, inclusive contra vírus de plantas (SILVA *et al.*, 2011).

Esses compostos naturais bioativos podem contribuir para a redução no uso de pesticidas, em estratégias de MIP na proteção dos produtos durante a etapa de armazenamento e comercialização, como também são de especial interesse em sistemas de produção orgânicos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade repelente do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* contra adultos de *A. diaperinus*, com o objetivo de avaliar o potencial desse produto natural para aplicação no combate a essa praga em estratégias de (MIP).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e extração do óleo essencial

Frutos maduros de *S. terebinthifolius* foram coletados de árvores situadas no Campus Aristóteles Calazans Simões da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), em Maceió, Alagoas, em novembro de 2016 (Figura 1). A identificação da planta foi realizada pela bióloga Rosângela P. Lyra-Lemos do Herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente de Alagoas (IMA-AL), onde foi depositada exsicata botânica com registro IMA nº 63595.

O OE foi extraído dos frutos frescos e macerados por destilação por arraste de vapor d'água (400 g do fruto triturado em 8 L de água destilada), durante 4 horas. Após separação da fase aquosa, a porção de óleo foi armazenada em vidro âmbar sob refrigeração (- 4 °C) até o uso. A extração foi feita em triplicata e o rendimento do óleo foi calculado através da relação “g de OE / 100g de pimenta”.

Figura 1: *Schinus terebinthifolius*, ramo com frutos.



(Fonte: Autora, 2018)

Foto da árvore com os frutos da *Schinus terebinthifolius* Raddi

2.2. Análise do óleo essencial por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG-DIC) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

O óleo essencial foi analisado em equipamento da marca Shimadzu, modelo GC-2010 Plus, equipado com um detector de ionização de chama (DIC) e coluna capilar da marca Restek®, modelo Rtx-1 (30m x 0,25mm, com 0,25µm de espessura do filme). As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas a 260 °C; o hélio foi o gás carreador com taxa de fluxo de 1.0 mL.min⁻¹; programação de temperatura de 60 °C (2 min) para 180 °C a 2 °C.min⁻¹ e depois de 180 °C (4 min) para 260 °C a 10 °C.min⁻¹, permanecendo na temperatura final de 260 °C por 10 min. Uma amostra diluída (1 mg em 10 mL de hexano) de 1 µL foi injetada no modo split (razão 1:50). Foi realizado cálculo do índice de retenção relativo de cada composto em relação a uma série homóloga de n-alcanos C7-C30 (Sigma-Aldrich) injetada nas mesmas condições aplicadas ao óleo. A quantificação relativa com base na porcentagem da área dos picos foi feita com base nas análises por CG-DIC.

Para as análises por CG-EM, foram aplicadas as mesmas condições e temperaturas descritas para o CG-DIC, em um equipamento Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 Ultra (modo EI 70 eV, temperatura de 250 °C, modo de varredura entre 35 a 400 m/z). A identificação dos componentes do óleo essencial foi feita pela análise dos espectros de massas, pela comparação de seus espectros com bases de dados NIST08 e Wiley 275L, utilizando ainda as informações sobre o índice de retenção linear obtido nas análises no CG-DIC e comparação com padrões sintéticos, quando possível.

2.3. Insetos

Alphitobius diaperinus foram coletados em camas de frangos de corte em galpões avícolas comerciais, em uma propriedade particular, no município de Maceió, Alagoas-Brasil, cuja latitude é de 9°39'57"S e longitude 35°44'6"O. Os insetos foram encaminhados para o Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais, da Universidade Federal de Alagoas. A colônia de insetos foi mantida em caixas plásticas, contendo ração de frango farelada e algodão, e acondicionadas em câmara com temperatura de 30 ± 2°C, umidade relativa de 60 ± 10% e fotoperíodo de 12:12 (L:D). O algodão foi utilizado para servir de abrigo aos insetos, facilitando a postura dos ovos e o desenvolvimento das pupas.

A identificação dos insetos foi confirmada por pesquisa no Museu da ESALQ (Museu da ESALQ, 2004) e no Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), pelo Dr. Sinval Silveira Neto.

2.4. Bioensaios em olfatômetro

A resposta comportamental de *A. diaperinus* ao óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* foi avaliada por meio de bioensaios em olfatômetro em Y (EIRAS & MAFRA, 2001), sob iluminação uniforme difusa e temperatura de 26°C. O olfatômetro era composto por 2 braços. Cada um dos braços continha uma abertura, contendo estímulo ou controle, na qual era conectado a entrada de ar.

Os bioensaios foram realizados com diferentes amostras que serviram como estímulo: óleo aromático (doses de 1 e 10 µL); uma mistura de padrões sintéticos que foram identificados como atraentes para o *A. diaperinus* (nonanal, 4-etilbenzaldeído e 4-etilacetofenona) e a mistura de padrões sintéticos + óleo essencial. Como controle foi utilizado: apenas papel de filtro; óleo aromático e hexano, respectivamente. Os estímulos eram introduzidos em um dos braços, enquanto o outro braço serviu como controle.

O ar introduzido no olfatômetro foi previamente filtrado com carvão ativado e bombeado para dentro do sistema a um fluxo de aproximadamente 300 mL.min⁻¹ em cada braço, ao mesmo tempo em que foi bombeado para fora do olfatômetro através de abertura central na face inferior do mesmo a um fluxo de 600 mL.min⁻¹. Em cada bioensaio foi utilizado um novo inseto, nova fonte de estímulo e olfatômetro trocado a cada cinco bioensaios.

O adulto de *A. diaperinus*, era introduzido no centro do olfatômetro, e contados 1 minuto para aclimação do inseto ao ambiente. Em seguida, sua posição começava a ser registrada durante 10 minutos, contabilizando-se o tempo gasto e o número de entradas em cada braço, com auxílio de um cronometro. Os insetos que não realizassem pelo menos 3 entradas nos primeiros 5 minutos do bioensaio eram considerados inativos e substituídos. Foram realizadas 30 repetições.

2.5. Análise estatística

As análises de comportamento dos insetos foram submetidos ao teste do Qui-quadrado, com nível de significância de 1%. Os cálculos foram realizados, manualmente, através da fórmula:

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e]$$

Em que:

- ✓ o = frequência observada para cada classe,
- ✓ e = frequência esperada para aquela classe

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Constituintes químicos do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius*

O rendimento do óleo essencial obtido dos frutos de *S. terebinthifolius* foi de 2,20 g de OE por 100 g de pimenta, assemelhando-se a valores descritos na literatura (BENDAOU *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Os resultados das análises por CG-DIC e CG-EM estão compilados na Tabela 1. Foram identificados 14 componentes no óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius*, correspondente a 96,13 % do óleo total.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial dos frutos maduros de *Schinus terebinthifolius raddi*.

Composto	TR	LRI	*Área do Pico %
4-aliloxi-2-metil-2-pentanol	6.870	899	0,06
Triciclono	7.493	915	0,73
α -tujeno ¹	7.620	918	0,08
α -pineno ¹	8.012	927	33,49
Canfeno ¹	8.503	940	0,66
β -pineno ¹	9.593	966	49,08
Mirceno ¹	10.213	982	0,72
3-careno ¹	11.183	1004	5,85
β -felandreno ¹	11.564	1011	0,62
Bornileno ¹	11.929	1018	1,21
α -terpineol ¹	20.121	1158	0,71
Bornil acetato (álcool monoterpeneo)	27.108	1266	0,73
Citronelil acetato (éster de ácido graxo)	31.270	1329	0,1
Germacrene D ²	38.998	1466	2,08
Total identificado			96,13
Rendimento			2,20

TR = Tempo de Retenção nas análises por CG-DIC; LRI = Índice de Retenção Linear, calculado a partir de uma equação linear baseada nos tempos de retenção dos compostos identificados em relação a uma série homóloga de n-alcenos C7-C30 (Sigma-Aldrich) injetada nas mesmas condições das amostras.

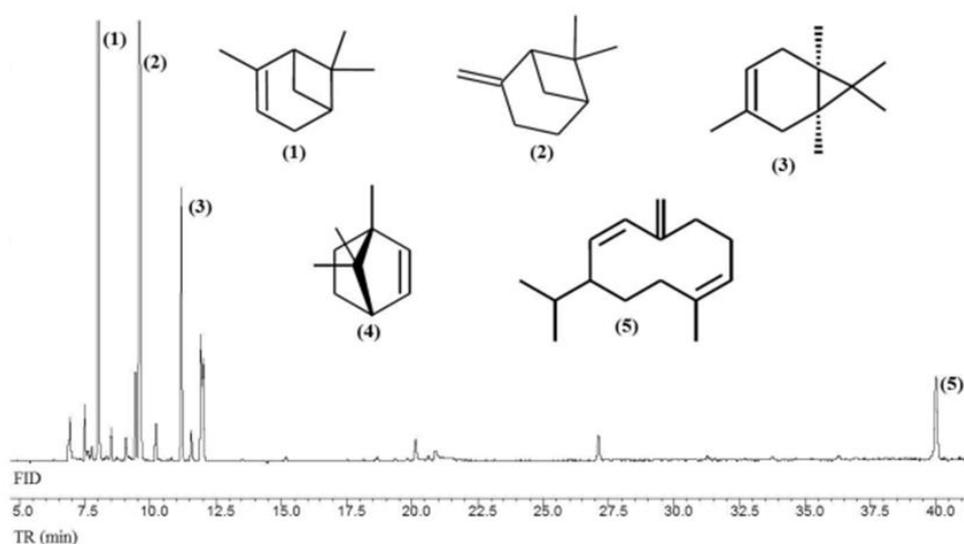
*Dados expressos como média (três repetições).

¹ Monoterpenos; ² Sesquiterpenos.

A alta concentração de monoterpenos no OE dos frutos de *S. terebinthifolius* (92,42%) demonstra um perfil semelhante ao encontrado em estudos anteriores, em que compostos dessa

classe representaram mais de 50% dos compostos identificados (AFFONSO *et al.*, 2012; DOS SANTOS CAVALCANTI *et al.*, 2015; ENNIGROU *et al.*, 2017). A Figura 2 mostra o perfil cromatográfico do OE dos frutos, destacando os picos dos compostos principais do óleo essencial: α -pineno (1; 33,49 %), β -pineno (2; 49,8%), 3-careno (3; 5,85%), bornileno (4; 1,21%) e germancreno-D (5; 2,08%).

Figura 2 Cromatograma CG-FID do óleo essencial dos frutos maduros de *Schinus terebinthifolius* Raddi, com compostos principais em destaque: α -pineno (1), β -pineno (2), 3-careno (3), bornileno (4) e germancreno-D (5).



Diversos fatores podem influenciar a composição do OE de *S. terebinthifolius*, como a localização, a época de colheita e o estágio de maturação dos frutos (ENNIGROU *et al.*, 2017). Diferentes concentrações relativas e proporções enantioméricas dos monoterpênicos majoritários do OE dos frutos de *S. terebinthifolius*: α -pineno (28.6-88.9%) e β -pineno (2.3-15.7%), α -felandreno (traço-36.5%) e β -felandreno (0.6-14.7%) e limoneno (2.5-13.6%), provenientes de diferentes localidades da Alemanha e França, foram descritos por Richter *et al.* (2010).

3.2. Resposta comportamental de *Alphitobius diaperinus*

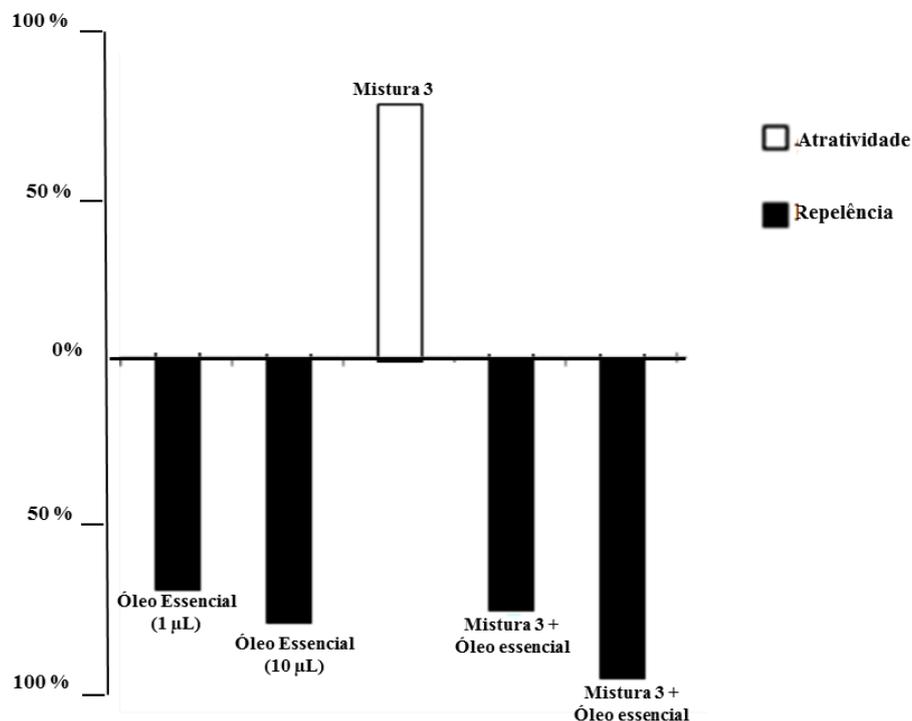
Os compostos principais encontrados no OE de *S. terebinthifolius*, α -pineno e β - pineno já tiveram a atividade fumigante e toxicidade por contato descritas contra alguns coleópteros, como *L. serricornis*, tendo sido isolados a partir do OE do rizoma de *Alpinia kwangsiensis*, no qual também figuraram entre os componentes principais (10,50 e 11,15%, respectivamente) (WU *et al.*, 2015).

O OE das folhas de *Pistacia lentiscus*, uma Anacardiaceae da região do Mediterrâneo, também apresentou o α -pineno como um de seus componentes majoritários (9,48%) e mostrou forte atividade fumigante contra *L. serricornis* (BACHROUCH *et al.*, 2010).

O 3-careno é outro composto identificado neste trabalho como um dos componentes majoritários do OE dos frutos de *S. terebinthifolius* que também já foi descrito como repelente contra insetos. Estudos de Omolo *et al.* (2004) e Odalo *et al.* (2005) com diferentes plantas do Quênia, apontaram o 3-careno como um dos compostos com maior atividade repelente contra o mosquito *Anopheles gambiae*, principal vetor da malária na África.

A figura 3 mostra que os insetos adultos de *A. diaperinus* permaneceram significativamente mais tempo nos braços controle do olfatômetro (papel filtro), que no braço onde estava o OE de *S. terebinthifolius* na dose de 10 μ L, indicando uma forte atividade repelente do óleo. Entretanto, quando a dose foi reduzida para 1 μ L, foi observada uma atividade repelente menor do OE, quando comparado à dose de 10 μ L, tendo como controle apenas o papel de filtro (P<0,001). Os resultados dos bioensaios comportamentais indicam ainda que o poder de repelência do OE de *S. terebinthifolius* contra *A. diaperinus* diminui com a redução da concentração aplicada (dose), assim como observado para os OEs da planta de *Azadirachta indica* A. Juss e *Cymbopogon wynterianus* Jowitt (MARQUES *et al.*, 2013), das folhas de *Atalantia guillauminii* (YANG *et al.*, 2014), das raízes de *Dictamnus dasycarpus* (YANG *et al.*, 2015), das partes aéreas de *Liriope muscari* (WU *et al.*, 2015) e do pó dos frutos de *Litsea cubeba* (YANG *et al.*, 2014). Azevedo *et al.* (2010) constataram que a diminuição da concentração do OE das sementes de nim pode reduzir em até 20% a taxa de mortalidade de *A. diaperinus*, corroborando com Santos *et al.* (2007) ao verificarem que a diminuição da concentração do OE das folhas de *S. terebinthifolius* pode reduzir em até 40% a taxa de mortalidade de *A. obtectus* e em 20% a de *Z. subfasciatus*. Ahlana C. T. de Campos *et al.* (2014) constataram que a taxa de mortalidade dos insetos aumenta com o incremento da dose do o OE testado, composto pelas folhas da carqueja doce (*Baccharis articulata*), independentemente do tempo de exposição.

Figura 3 Resultados dos bioensaios de comportamento de *Alphitobius diaperinus* com óleo essencial (OE), mistura 3 dos padrões sintéticos (atraentes para *A. diaperinus*), mistura 3 dos padrões sintéticos + óleo essencial (controle: hexano) e mistura 3 dos padrões sintéticos + óleo essencial (controle: óleo aromático).



A mistura do óleo essencial (OE) foi testada em conjunto com os compostos sintéticos atraentes para o *A. diaperinus* (capítulo 2 dessa tese), esses compostos foram identificados dos extratos oriundos das aves e do ambiente das aves por aeração. A mistura de maior poder atraente composta por nonanal, 4-etilbenzaldeído e 4-etilacetofenona foi adicionada ao óleo essencial (OE) e testada em olfatômetro do tipo Y. O óleo essencial de *S. terebinthifolius* inibiu a ação atraente da mistura sintética. O hexano foi usado como controle.

Porém, quando a mistura dos padrões sintéticos + óleo essencial (OE) foram testados, tendo como controle o óleo essencial, foi observado mais de 90% de repelência de *A. diaperinus* ao OE de *S. terebinthifolius*, em relação à mistura. Embora a atividade repelente dos OEs seja geralmente atribuída a alguns compostos particulares, pode ocorrer um efeito sinérgico entre os metabólitos integrantes do óleo como um todo, inclusive os componentes minoritários, que resulta em uma bioatividade maior quando comparada com a desses compostos isolados (OMOLO et al., 2004). Outro fator importante é que o efeito protetivo dos OEs tende a diminuir com o tempo, devido à alta volatilidade de seus compostos, levando à necessidade do

desenvolvimento de produtos e tecnologias de liberação que mantenham a ação repelente por mais tempo (NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010).

Esses fatores, assim como as concentrações ideais de aplicação do OE dos frutos de *S. terebinthifolius* a serem utilizadas na proteção da cama aviária, usada dentro do galpão de frangos de corte, sem que venham a ser prejudiciais à saúde das aves, deverão ser cuidadosamente avaliados para que este bioproduto possa ser utilizado no manejo de *A. diaperinus*.

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que o OE dos frutos maduros de *S. terebinthifolius* possui atividade repelente contra adultos de *A. diaperinus* nas doses de 1 μ L e 10 μ L, assim como atua inibindo a ação dos atraentes em uma mistura, revelando potencial para uso no controle do *A. diaperinus*. Uma combinação de atraentes e repelentes pode ser útil em uma estratégia “push-pull” para o controle do *A. diaperinus*. Os padrões sintéticos podem ser usados fora dos galpões como atraentes do *A. diaperinus*, enquanto o óleo essencial seria de uso interno ao aviário. Dessa forma, estudos futuros deverão ser empreendidos para completa compreensão dos mecanismos envolvidos na bioatividade do OE sobre *A. diaperinus*, para determinar as condições ótimas de uso no manejo dessa praga.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. A Rosângela P. Lyra-Lemos, do IMA-AL, pela identificação botânica de *S. terebinthifolius*, e ao Dr. Sinval Silveira Neto, da ESALQ/USP, pela identificação taxonômica dos insetos, ao técnico de laboratório Sr. Aldy dos Santos e a mestranda Regina da Silva Acácio Melo pela produção do óleo essencial.

5. REFERÊNCIAS

1. AFFONSO, C. R. G.; FERNANDES, R. M.; OLIVEIRA, J. M. G. DE; LIMA, S. G. DE; ZANINI, S. F. Effects of the essential oil from fruits of *Schinus terebinthifolius Raddi* (Anacardiaceae) on reproductive functions in male rats. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, n. 1, p. 180–185, 2012.
2. AHLANA C. T. DE CAMPOS et al. Atividade repelente e inseticida do óleo essencial de carqueja doce sobre o caruncho do feijão. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. Campina Grande, PB, UAEEA/UFCG . v.18, n.8, p.861–865, 2014.
3. ALVES, L. F. A. *et al.* Ação Da Terra De Diatomácea Contra Adultos Do Cascudinho. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 73, n. 1, p. 115–118, 2006.
4. AZEVEDO, A. I. B. DE *et al.* Bioatividade do óleo de nim sobre *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) em sementes de amendoim. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 14, p. 309–313, 2010.
5. AZEVEDO, AI B, LIRA, AS, CUNHA, LC, ALMEIDA, FAC, ALMEIDA, RP. Bioatividade do óleo de nim sobre *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) em sementes de amendoim. *Revista Brasileira Engenharia Agrícola Ambiental*, 2010. 14(3):309–313.
6. AZEVEDO, C. F.; QUIRINO, Z. G. M.; BRUNO, R. L. A. Estudo farmacobotânico de partes aéreas vegetativas de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius raddi*, anacardiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, n. 1, p. 95–102, 2015.
7. BACHROUCH, O. *et al.* Fumigant toxicity of *Pistacia lentiscus* essential oil against *Tribolium castaneum* and *Lasioderma serricorne*. *Bulletin of Insectology*, v. 63, n. 1, p. 129–135, 2010.
8. BENDAOU, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J. P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle L.* and *Schinus terebinthifolius Raddi* Berries Essential Oils. , v. 75, n. 6, p. 466–472, 2010.
9. CHERNAKI, A.M (2004) **Dinâmica populacional, estimativa da resistência a inseticidas e suscetibilidade do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) a inseticidas reguladores de crescimento e a fungos entomopatogênicos.** Tese de doutorado.Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 62 p.
10. COLE, E. R.; SANTOS, R. B.; JÚNIOR, V. L.; et al. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius Raddi* and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 828, p. 821–828, 2014.
11. DESPINS, J. L. *et al.* Evaluation of methods to protect poultry house (Coleoptera : Tenebrionidae) 1 . 2 Insecticide Residual Experiment in the Laboratory. *J. Agric. Entomol*, v. 8, n. 3, 1991.
12. EBC (Empresa Brasil de Comunicação). Ribeirinhos aumentam renda com projeto de pimenta rosa em Alagoas. Disponível em: . Acesso em: 14 nov. 2017.
13. EIRAS, A. E.; MAFRA-NETO, A. Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento de insetos. In: VILELA, E.F.; DELLA-LUCIA, T. M.C. (Eds). *Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas*. 2 ed. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001. p. 27-39.
14. ENNIGROU, A. *et al.* Maturation-related changes in phytochemicals and biological activities of the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius Raddi*) fruits. *South African Journal of*

Botany, v. 108, p. 407–415, 2017.

15. GIAMBRONE, JJ, MACKLIN, KS (2012) Detection of infectious *laryngotracheitis virus* from darkling beetles and their immature stage (lesser mealworms) by quantitative polymerase chain reaction and virus isolation. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 21, n. 1, 33-38. <http://dx.doi.org/10.3382/japr.2010-00314>
16. HAMM PB, HY CW, HUTCHINSON PJ, STEVENSON WR, BOYDSTON RA, ALVAREZ JM, ALYOKIN A, DIVELY G, GUDMESTAD NC, AND KIRK WW. Managing pesticide resistance. In *Potato Health Management. Plant Health Management Series* (Ed. D.A. Johnson). American Phytopathological Society, St Paul, MN, USA. Second Edition. p. 123-131, 2008.
17. HILBERT F, SMULDERS FJM, Chopra-Dewasthaly R, Paulsen P (2012) *Salmonella* in the wildlife-human interface. *Food Res Int* 45:603–608. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.015>
18. JIANG ZL, AKHTAR Y, ZHANG X, BRADBURY R, ISMAN MB. Insecticidal and feeding deterrent activities of essential oils in the *cabbage looper*, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*, 2012. 136: 191–202. doi: 10.1111/j.1439-0418.2010.01587.x
19. LAMBKIN TA (2011) Trialling biological agents for the management of lesser mealworm in Australian broiler houses. Rural Industries Research and Development Corporation. Electronically published by RIRDC in April 2011. Print-on-demand by Union Offset Printing, Canberra, Austrália. 2011. website <www.rirdc.gov.au>.
20. LEFFER, AM, KUTTEL, J, MARTINS, LM, PEDROSO, AC, ASTOLFI-FERREIRA, CS, FERREIRA, F, FERREIRA, AJP (2010) Vectorial competence of larvae and adults of *Alphitobius diaperinus* in the transmission of *Salmonella* Enteritidis in poultry. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. v. 10, issue 5, p. 481-487. doi:10.1089/vbz.2008.0089
21. LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5o ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.
22. MARQUES, C. R. G. *et al.* Mortalidade de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) por óleos de nim e citronela. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 6, p. 2565–2574, 2013.
23. MATSUO, A. L.; FIGUEIREDO, C. R.; ARRUDA, D. C.; et al. Biochemical and biophysical research communications α -pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 411, n. 2, p. 449–454, 2011.
24. NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 372-378, 2010.
25. ODALO, J. O.; OMOLO, M. O.; MALEBO, H.; ANGIRA, J.; NJERU, P. M.; NDIEGE, I. O.; HASSANALI, A. Repellency of essential oils of some plants from the Kenyan coast against *Anopheles gambiae*. *Acta Tropica*, v. 95, p. 210–218, 2005.
26. OLIVEIRA, L. F. M.; OLIVEIRA, L. F. G.; SANTOS, M. C.; NARAIN, N.; LEITE NETA, M. T. S. Tempo de destilação e perfil volátil do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius*) em Sergipe. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 16, n. 2, 2014.

27. OLTON, G. S. Worldwide Survey and Comparison of Adult β ™ Predator and Scavenger Insect Populations Associated with Domestic Animal Manure Where Livestock Is Artificially Congregated. v. 40, n. 9, 1970.
28. OMOLO, M. O.; OKINYO, D.; NDIEGE, I. O.; LWANDE, W.; HASSANALI, A. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry*, v. 65, p. 2797–2802, 2004.
29. PICCINELLI, A. C.; SANTOS, J. A.; KONKIEWITZ, E. C.; OESTERREICH, S. A.; FORMAGIO, A. S.; CRODA, J.; ZIFF, E. B.; KASSUYA, A. L. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. *Nutritional Neuroscience*, v. 18, n. 5, p. 217–224, 2015.
30. RICHTER, R.; REUS, S. H. VON; KÖNIG, W. A. Phytochemistry spirocyclopropane-type sesquiterpene hydrocarbons from *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Phytochemistry*, v. 71, n. 11–12, p. 1371–1374, 2010.
31. SANTOS, M. R. A. DOS; LIMA, R. A.; SILVA, A. G.; et al. Atividade inseticida do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre *Acanthoscelides obtectus* Say e *Zabrotes subfasciatus* Boheman. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento EMPRAPA Rondônia*, v. 48, 2007. 13p.
32. SKOV, MN (2004) The role of litter beetles as potential reservoir for *Salmonella* enterica and thermophilic *Campylobacter* spp. between broiler flocks. *Avian disease*, v. 48, p. 9-18. doi:10.1637/5698.
33. DOS SANTOS CAVALCANTI, A.; ALVES, M. DE S.; DA SILVA, L. C. P.; et al. Volatiles composition and extraction kinetics from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* leaves and fruit. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 25, n. 4, p. 356–362, 2015.
34. SILVA, M.A. et al. Óleo essencial de aroeira vermelha como aditivo na ração de frangos de corte. *Ciência Rural*, v.41, n.4, p.676-681, 2011.
35. SZCZEPANIK M, SZUMNY A. Insecticidal activity of star anise (*Illiciumverum* Hook. F.) fruits extracts against the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae). *Allelopathy Journal* 27: 277–288. 2011.
36. WU, Y. et al. Contact toxicity and repellency of the essential oil of *Liriope muscari* (Decn.) bailey against three insect tobacco storage pests. *Molecules*, v. 20, n. 1, p. 1676–1685, 2015.
37. YANG, K. et al. Bioactivity of essential oil of *Litsea cubeba* from China and its main compounds against two stored product insects. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, v. 17, n. 3, p. 459–466, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2014.03.011>>.
38. YANG, K. et al. Contact toxicity and repellency of the essential oil of *dictamnus dasycarpus* roots from China against two stored-product insects. *Chemistry and Biodiversity*, v. 12, n. 6, p. 980–986, 2015.
39. YOU, C. X.; JIANG, H. Y.; ZHANG, W. J.; GUO, S. S.; YANG, K.; LEI, N.; MA, P.; GENG, Z. F.; DU, S. S. Contact toxicity and repellency of the main components from the essential oil of *Clausena anisum-olens* against two stored product insects. *Journal of Insect Science*, v. 15, n. 1, p.87, 2015.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo dessa tese objetivou investigar e identificar os compostos orgânicos voláteis liberados pelas aves, cama aviária (ambiente), ração e componentes da ração (grãos de milho, farelo de soja e farinha de carne) com atratividade para adultos de *A. diaperinus*. Assim como avaliar a atividade repelente do óleo essencial (OE) dos frutos maduros de *Schinus terebinthifolius* contra adultos de *A. diaperinus*, a fim de promover a prospecção de compostos naturais com potencial para aplicação no manejo integrado dessa praga em ambientes de aves.

As análises por cromatografia gasosa acoplada à eletroantografia e espectrometria de massas permitiram a identificação de 4 compostos orgânicos voláteis no headspace dos componentes da ração e da ração composta, capazes de desencadear resposta eletrofisiológica nas antenas de *A. diaperinus*: nonanal, 4-etilbenzaldeído, 4-etilacetofenona e geranilacetona. Todos foram significativamente atraentes (nonanal, 4-ethylbenzaldeído e 4-ethylacetofenona), exceto a geranilacetona, que se mostrou repelente nas três concentrações.

A resposta dos adultos de *A. diaperinus* à mistura dos 4 compostos sintéticos foi equivalente à observada para as aves, componentes da ração e ração composta nos bioensaios em olfatômetro, com exceção do geranilacetona, que tem ação repelente, quando testado sozinho, quando foi misturado aos 3 compostos atraentes, sua ação repelente foi inibida.

No entanto, quando os compostos sintéticos foram misturados a uma concentração de 10 ppm e testados juntos, a resposta do *A. diaperinus* foi significativamente atraente ($P < 0,001$). Foram testadas três misturas, a mistura 1, composta pelo nonanal, 4-ethylbenzaldeído, 4-ethylacetofenona e geranilacetona. A mistura 2, composta pelo 4-ethylbenzaldeído e 4-ethylacetofenona e a mistura 3 composta pelo nonanal, 4-ethylbenzaldeído, 4-ethylacetofenona. O *A. diaperinus* apresentou resposta significativa as três misturas, demonstrando maior atratividade pela mistura 2.

Portanto, conclui-se que os compostos identificados no headspace das aves, dos componentes da ração e da ração composta podem ser considerados compostos voláteis atraentes para *A. diaperinus*.

A análise química do óleo essencial dos frutos maduros de *S. terebinthifolius* por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas permitiu a identificação de 14 compostos, equivalentes a 96,13% do óleo. Os compostos majoritários do óleo foram β -pineno (49,8%), α -pineno (33,49%), 3-careno (5,85%), germancreno-D (2,08%) e bornileno (1,21%). Nos bioensaios em olfatômetro, os insetos adultos de *A. diaperinus* permaneceram significativamente mais tempo nos braços controle do olfatômetro, que no braço tratado com o óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* nas doses de 1 μL e 10 μL , assim como no bioensaio realizado com a mistura do

óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* + padrões sintéticos, tendo como controle o OE, mais de 90% dos insetos foram repelidos.

Diante do exposto, é possível concluir que o óleo possui atividade repelente contra adultos de *A. diaperinus*, revelando potencial para uso dentro do galpão, na cama aviária, na proteção de aves e galpões avícolas, assim como a atividade atraente dos compostos voláteis para essa praga. Uma alternativa de controle dessa praga seria usar o óleo essencial dentro galpão, adicionado a cama aviária e os compostos voláteis serem utilizados fora do galpão, como atraentes dos insetos, o que seria uma estratégia “push pull”. Porém mais estudos devem ser realizados, a fim de testar os compostos voláteis e a melhor concentração a ser aplicada no campo, bem como testar a melhor dosagem do óleo essencial e a quantidade a ser utilizada na cama aviária.

APÊNDICE – A

FIGURAS DO ARTIGO I SUBMETIDO AO JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY.

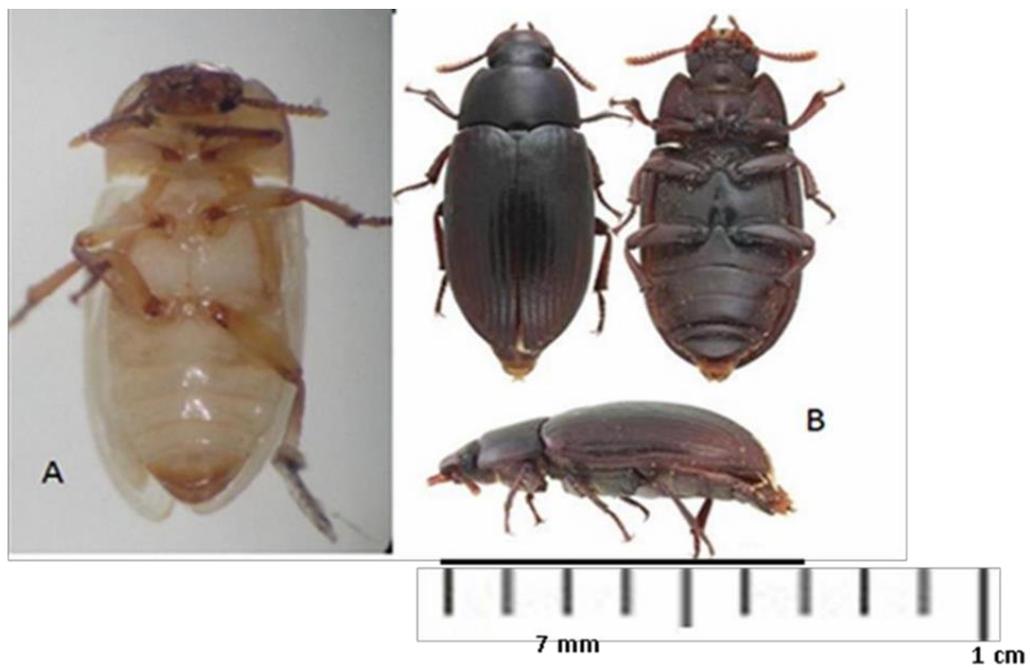


Figure 5 *Alphitobius diaperinus* adults: A) newly emerged, without chitin; B) adults with chitinised exoskeleton.

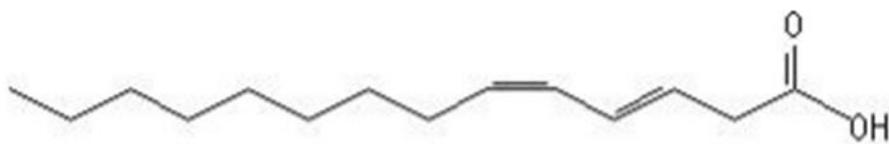


Figure 6 Chemical structure of (*E,Z*)-3,5-tetradecadienoic acid

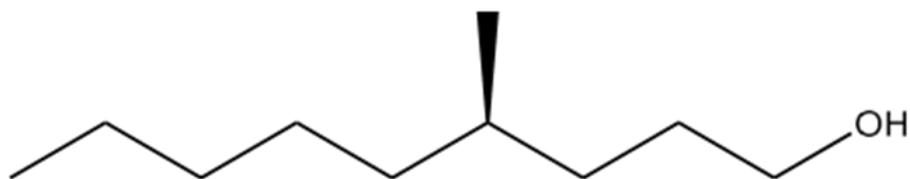


Figure 7 Chemical structure of R (+)-4-methyl-1-nonanol

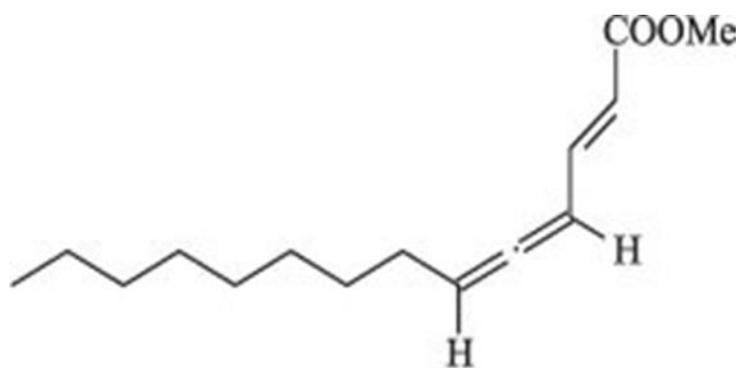


Figure 8 Chemical structure of methyl (R)-(E)-2,4,5-tetradecatrienoate

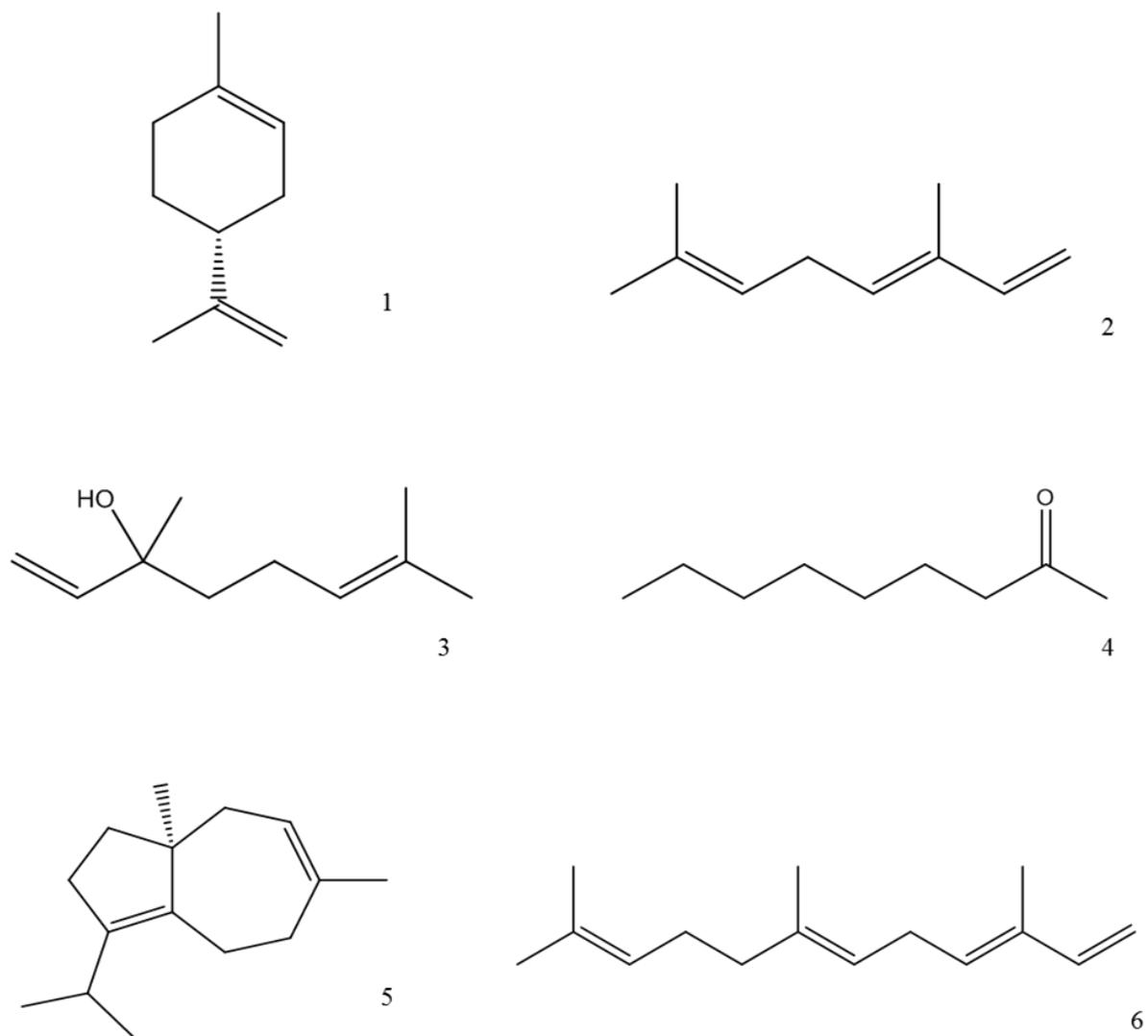
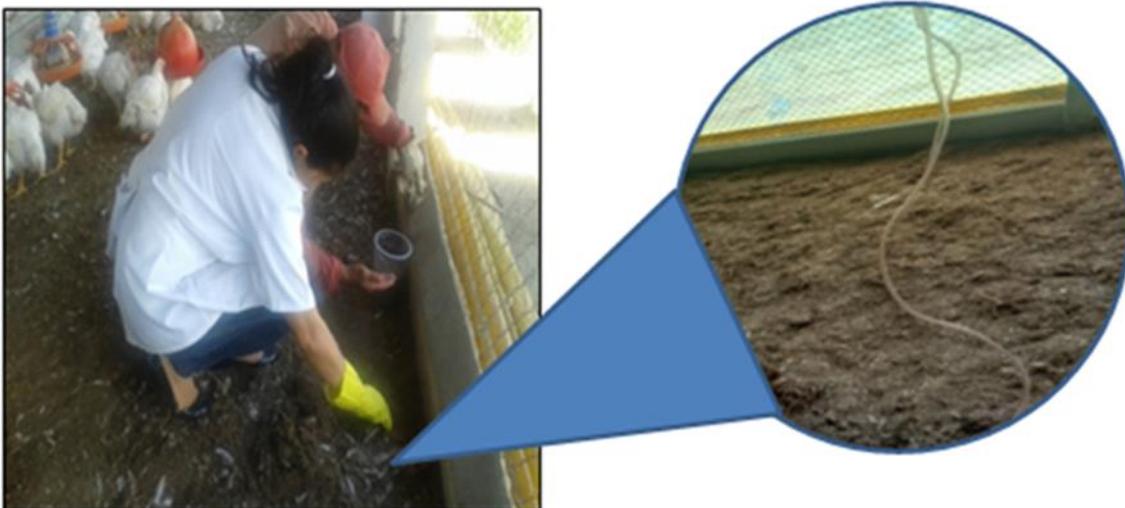


Figure 9 Chemical structures of the pheromone constituent of *A. diaperinus*: Limonene (1), (*E*)- β -ocimene (2), linalool (3), 2-nonanone (4), (*R*)-daucene (5), and (*E,E*)- α -fernesene (6)

APÊNDICE – B

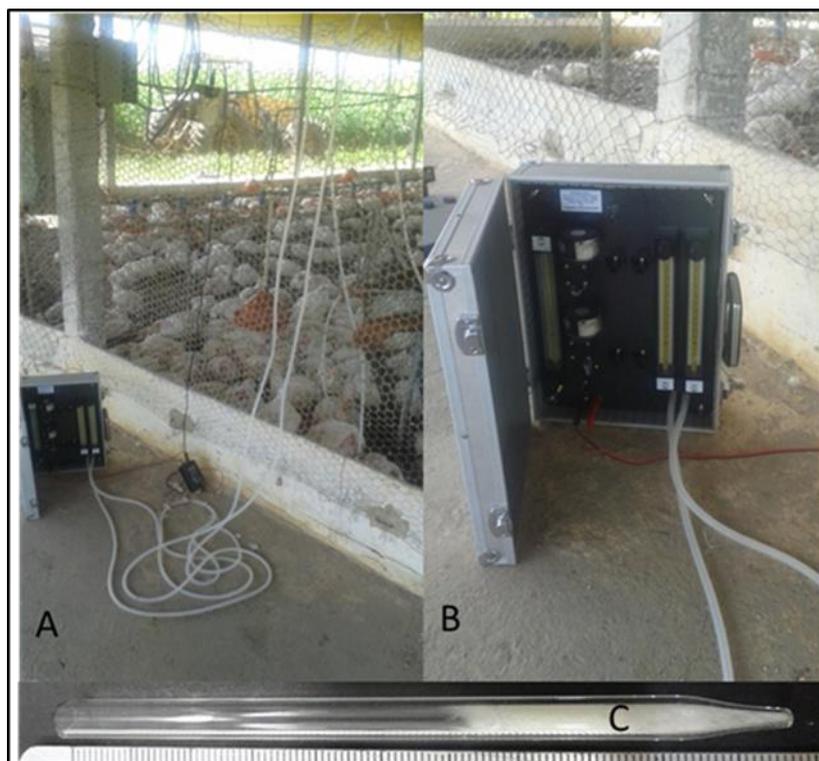
Figuras relativas à parte experimental do Capítulo 2.



Coleta de Insetos nos galpões.



Infestação do *Alphitobius diaperinus* na estrutura do galpão de frangos de corte.



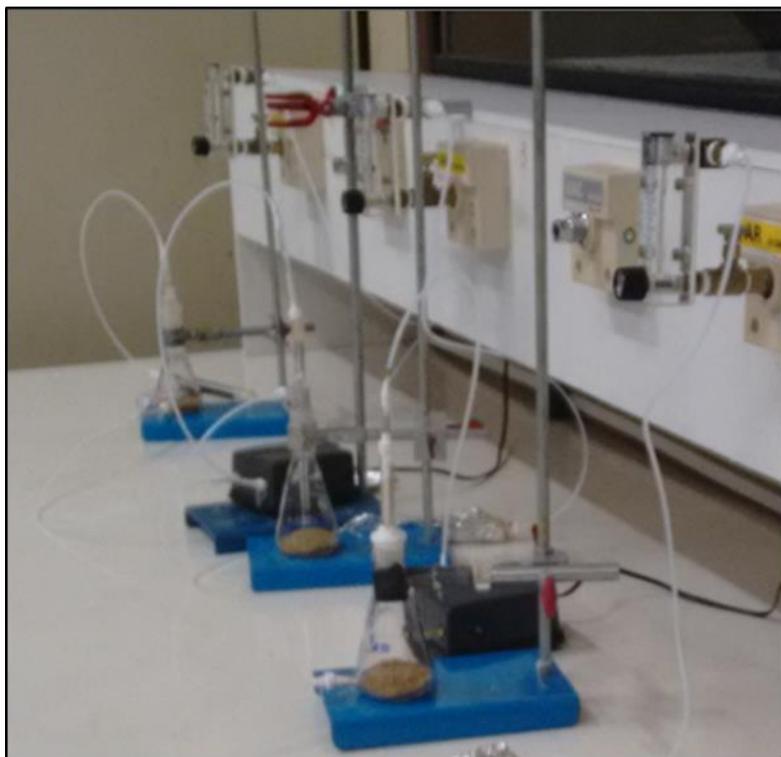
A) Coleta dinâmica do *headspace* nas aves, realizada no campo;.

B) Maleta coletora de voláteis

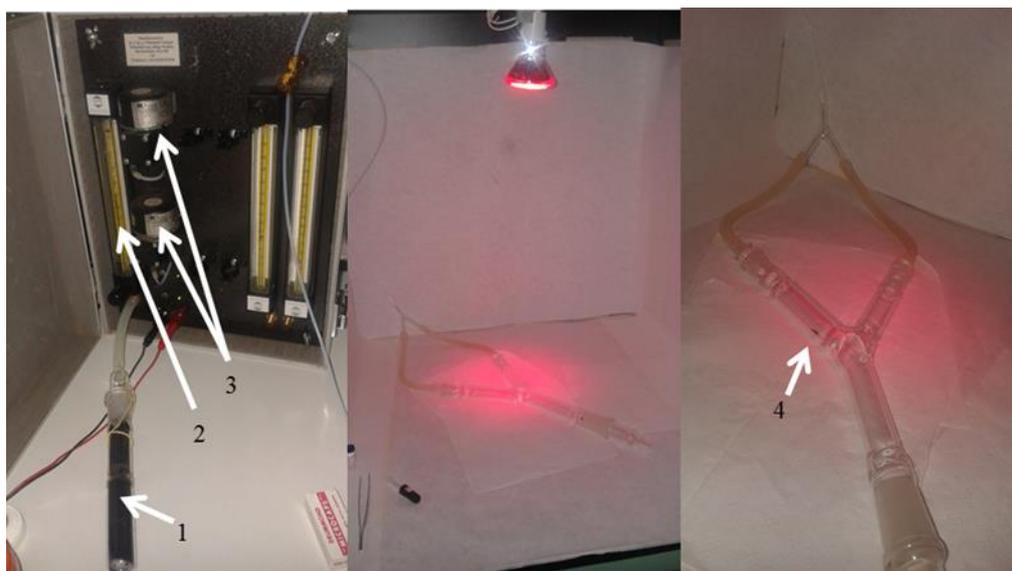
C) Tubo de vidro, usado para a coleta dinâmica do *headspace* nas aves (trap).



Aeração das aves com 01 e 40 dias de vida.

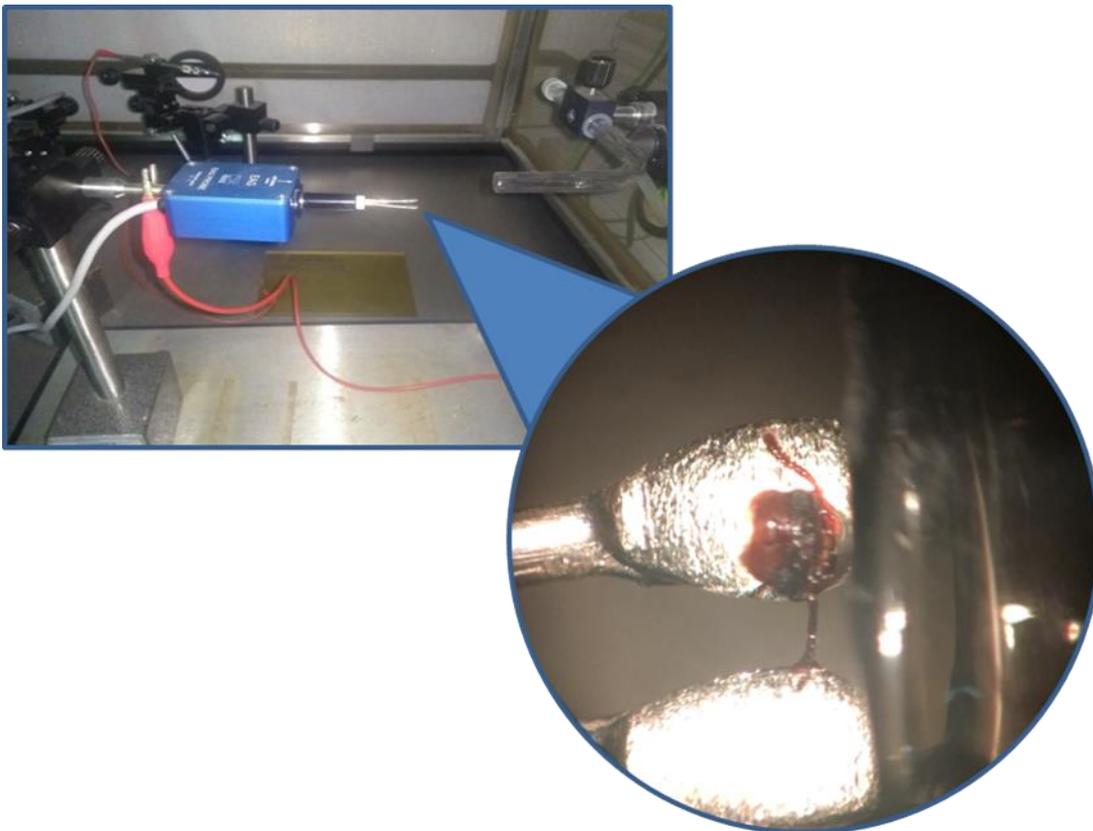


Coleta dinâmica do *headspace* na ração, realizada no laboratório.



A) Bioensaio em olfatômetro em Y:

- 1- Carvão ativado;
- 2- Sistema de bombeamento de ar: - fluxômetros;
- 3- Bombas de ar.
- 4- *A.diaperinus*



Eletroantennografia com eletrodo de platina e gel condutor.