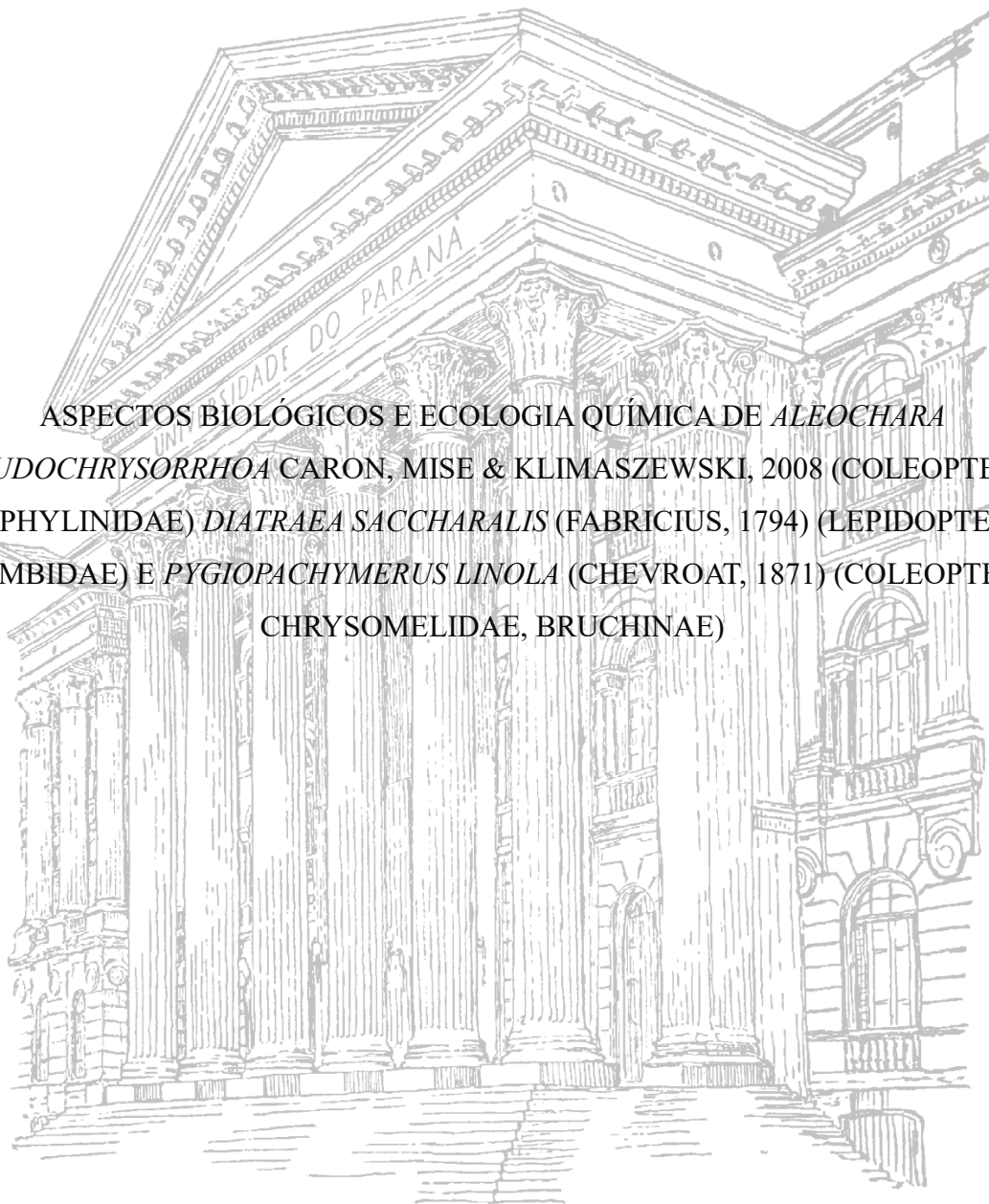


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAYCON ROBERTO DA SILVA



ASPECTOS BIOLÓGICOS E ECOLOGIA QUÍMICA DE *ALEOCHARA*
PSEUDOCHRYSORRHOA CARON, MISE & KLIMASZEWSKI, 2008 (COLEOPTERA:
STAPHYLINIDAE) *DIATRAEA SACCHARALIS* (FABRICIUS, 1794) (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE) E *PYGIOPACHYMERUS LINOLA* (CHEVROAT, 1871) (COLEOPTERA,
CHRYSOMELIDAE, BRUCHINAE)

CURITIBA

2019

MAYCON ROBERTO DA SILVA

ASPECTOS BIOLÓGICOS E ECOLOGIA QUÍMICA DE *ALEOCHARA*
PSEUDOCHRYSORRHOA CARON, MISE & KLIMASZEWSKI, 2008 (COLEOPTERA:
STAPHYLINIDAE) *DIATRAEA SACCHARALIS* (FABRICIUS, 1794) (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE) E *PYGIOPACHYMERUS LINOLA* (CHEVROAT, 1871) (COLEOPTERA,
CHRYSOMELIDAE, BRUCHINAE)

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de Concentração em Entomologia, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Paulo Henrique Gorgatti Zarbin, Setor de Ciências Exatas, Departamento de Química

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Silva, Maycon Roberto da
Aspectos biológicos e ecologia química de *Aleochara*
pseudochrysorrhoea Caron, Mise & Klimaszewski, 2008
(Coleoptera:Staphylinidae) *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794)
(Lepidoptera:Crambidae) e *Pygiopachymerus lineola* (Chevrolat, 1871)
(Coleoptera,Chrysomelidae,Bruchinae). / Maycon Roberto da Silva. –
Curitiba, 2019.
164 p.: il.

Orientador: Paulo Henrique Gorgatti Zarbin
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Entomologia).

1. Insetos 2. Ecologia química 3. Compostos químicos 4.
Comportamento animal I. Título II. Zarbin, Paulo Henrique Gorgatti III.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Entomologia).

CDD (20. ed.) 595.7



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ENTOMOLOGIA) - 40001016005P5

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ENTOMOLOGIA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MAYCON ROBERTO DA SILVA** intitulada: *Aspectos biológicos e ecologia química de **Aleochara pseudochrysorrhoea** Caron, Mise & Klimaszewski, 2008 (Coleoptera: Staphylinidae) **Diatraea saccharalis** (Fabricius, 1794) (Lepdoptera: Crambidae) e **Pygipachymerus lineola** (Chevrolat, 1871) (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae), após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.*

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 21 de Fevereiro de 2019.

PAULO HENRIQUE GORGATTI ZARBIN
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

LÍGIA MIRANDA FERREIRA BORGES
Avaliador Externo (UFG)

CARLA FERNANDA FÁVARO
Avaliador Externo (UESC)

LUCÍA MASSUTTI DE ALMEIDA
Avaliador Interno (UFPR)

Dedico esta conquista à família que esteve sempre presente, bem como aos amigos de tantos conselhos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Paulo H. G. Zarbin pela orientação ao longo desses quatro anos.

A toda a minha família pelo apoio e carinho dedicados, principalmente a minha esposa Tatiana Carneiro da Rocha pela ajuda e suporte durante toda a tese.

A todos os amigos do Laboratório de Semioquímicos, UFPR, por toda a ajuda despendida a mim.

A doutoranda Samara Mendes Moreira de Andrade da Universidade de Ontário no Canadá, pela ajuda com a escrita em inglês e pelas ilustrações do comportamento de cópula da parte 2 do capítulo I.

Ao Dr. Vinicius Richard Sobrinho pelas sugestões no capítulo III.

A todos os colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, UFPR.

Ao *TAXon-line*, UFPR, pelas fotos presentes na tese.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica, UFPR, pelas micrografias presentes na tese.

Ao órgão financiador CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

“Se fui capaz de ver mais longe, foi porque me apoiei em ombros de gigantes”.
Sir Isaac Newton

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos estudar os aspectos biológicos e a ecologia química de três espécies distintas de insetos, abordando desde sua criação, comportamento, extração de voláteis, identificação estrutural e avaliação do comportamento dos indivíduos mediado pelos compostos químicos identificados. Desta forma, o trabalho está dividido em três capítulos, sendo que o capítulo 1 está dividido em três partes. O capítulo 1 aborda a ecologia química da família Staphylinidae e a descrição de estágios larvais de *Aleochara pseudochrysorrhoea*. Na primeira parte está apresentada uma revisão sobre os compostos químicos liberados por espécies de Staphylinidae e são discutidas as influências dos compostos químicos no comportamento das espécies, bem como a variação morfológica dos complexos glandulares abdominais responsáveis pela liberação de compostos químicos. Na parte dois é apresentado o estudo relacionado às glândulas terçais de *Aleochara pseudochrysorrhoea*. Com base nas análises de CG/EM foram identificados onze compostos nas secreções da glândula tergal de macho e fêmea de *A. pseudochrysorrhoea*: decano; 2-metilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; (Z)-undec-4-eno; undecano; 2-metoxi-3-metilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; dodecano; (Z)-tridec-4-eno; (Z)-tridec-6-eno; tridecano; dodecanal e (Z)-tetradec-9-enal. Nenhum composto sexo específico foi observado. As secreções presentes na glândula tergal de fêmeas de *A. pseudochrysorrhoea* dependendo da concentração agem como gatilho iniciando o comportamento de cópula em machos. Na parte três deste capítulo foi realizada a descrição morfológica das formas imaturas de *Aleochara pseudochrysorrhoea*. Foram descritos e ilustrados os estágios larvais de *Aleochara pseudochrysorrhoea*. O capítulo 2 aborda o estudo realizado com a broca-da-cana *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Diatraea saccharalis* é a principal praga relacionada às culturas de cana no Brasil. Devido ao ciclo de vida desta espécie ocorrer na sua maior parte dentro da cana-de-açúcar, métodos tradicionais de controle com inseticidas tem se demonstrado ineficientes no controle desta praga. Neste sentido, semioquímicos como feromônios sexuais podem ser ferramentas importantes no monitoramento e controle desta praga. Dois compostos haviam sido descritos na literatura por desencadearem respostas nas antenas e terem respostas positivas na atração em túnel de vento em machos, (Z,E)-hexadeca-9,11-dienal e (Z)-hexadec-11-enal. Entretanto, a mistura destes dois compostos se mostrou ineficiente em testes de campo, o que levou a ideia de que alguns compostos minoritários presentes na mistura feromonal de *D. saccharalis* ainda não haviam sido identificados. Estudos realizados previamente reinvestigaram os compostos presentes nas glândulas feromonais de fêmeas e identificaram outros dois compostos que desencadeiam respostas nas antenas de machos, (Z)-hexadec-9-enal e hexadecanal. Portanto, o objetivo deste capítulo foi testar a capacidade desses dois novos compostos em aumentar a atratividade de machos em experimentos de túnel de vento. Foi possível demonstrar que os dois novos compostos identificados nas glândulas feromonais de fêmeas de *D. saccharalis* aumentaram a atratividade de machos em experimentos de túnel de vento. O capítulo 3 trata do estudo da ecologia química da espécie *Pygiopachymerus lineola* (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae). Os besouros da subfamília Bruchinae (Coleoptera, Chrysomelidae) são um grupo monofilético de espécies especializadas na predação de sementes. *Pygiopachymerus lineola* é uma espécie Neotropical encontrada desde o México até o Brasil, tendo sido relatada alimentando-se principalmente de sementes da espécie de planta *Cassia* L. Até o momento, seis espécies dentro de Bruchinae

tiveram compostos sexo específicos identificados. Portanto, o objetivo deste capítulo foi identificar os compostos feromonais em *P. lineola*, determinar o período de atividade circadiana e período de liberação de feromônio durante o ritmo circadiano. As análises de CG/EM mostraram quatro compostos sexo específicos nos machos. Experimentos realizados em olfatômetro em Y demonstraram uma alta atração de fêmeas aos extratos dos machos. Foi demonstrado também que o período de atividade e de liberação de compostos feromonais é maior nas três últimas horas da fotofase.

Palavras-chave: Comunicação química, comportamento, identificação química, compostos bioativos.

ABSTRACT

The aim of this work was study the biological aspects and the chemical ecology of three distinct species, approaching rearing, behavior, volatile extraction, structural identification and the biological roles mediated by identified chemical compounds. This thesis is divided in three chapters, chapter one is also divided in three parts. Chapter 1 approaches the chemical ecology of the Staphylinidae family and the morphological description of immatures stages of *Aleochara pseudochrysorrhoea* species. The 1st part comprises a review about chemical compounds previously identified in the Staphylinidae family, describing the influences of the compounds in the behavior of the species, as well as the morphological variation between species in the glandular complex responsible for releasing the chemical compounds in this family. The 2nd part comprehend a study about the tergal gland secretion in the *Aleochara pseudochrysorrhoea* species. Using the GC/MS analysis it was identified eleven compounds in tergal gland secretion: decane; 2-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione; (Z)-undec-4-ene; undecane; 2-methoxy-3-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione; dodecane; (Z)-tridec-4-ene; (Z)-tridec-6-ene; tridecane; dodecanal and (Z)-tetradec-9-enal. Through bioassays it was demonstrated that the female tergal gland secretion is affective in initiate male copulatory response depending on concentration. The 3rd part is a morphological description of immatures stages of *Aleochara pseudochrysorrhoea* species. In this chapter is also described and illustrated all larval instars of *Aleochara pseudochrysorrhoea*. The chapter 2 is a study about the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). In this species population control in traditional ways is quite inefficient due to simultaneous presence of all developmental stages of the insect throughout the year. In this way, search for new strategies can be useful such as the use of sex pheromone in monitoring and control techniques. Two sex pheromone components have been reported in the literature to elicit antennal activity and positive responses in flight tunnel experiments, (Z,E)-hexadec-9,11-adienal and (Z)-hexadec-11-enal. However, attractiveness of these two compounds has been reported as very low in field tests. A previously study identified another two compounds in the female pheromonal gland to elicit antennal activity in males of *D. saccharalis*. Therefore, the goal of this chapter was to test if these two new identified compounds increase male attractiveness in flight tunnel experiments. It was demonstrated that these two new identified compounds, in fact, increase male attractiveness in flight tunnel experiments. The chapter 3 is a study about the chemical ecology in the seed beetles *Pygiopachymerus lineola* (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae). Seed beetles are a monophyletic group, specialized in seed predation. *Pygiopachymerus lineola* is a Neotropical species, which has been found from Mexico to Brazil and have been found mostly feeding in seeds of *Cassia* genus species. Seed beetles sex pheromone have been identified only for six species to date. Therefore, the aim of this study was to identify sex specific pheromones in *Pygiopachymerus lineola*, determine the period of major activity and pheromone release throughout the circadian rhythm. GC/MS analysis demonstrated four male specific compounds, which attracts female in Y-tube olfactometer assays. The period of major activity as well as the period of sex pheromone releasing occur in the last hours of photophase.

Key words: Chemical communication, behavior, chemical identification, bioactive compounds.

LISTA DE FIGURAS
CAPÍTULO I: PARTE 1

FIGURA 1-	DESENHO ESQUEMÁTICO EM FACE DORSAL DE UM INDIVÍDUO DE ALEOCHARINAE, DESTACANDO A GLÂNDULA TERGAL.....	37
FIGURA 2-	DESENHO ESQUEMÁTICO MOSTRANDO O COMPLEXO GLANDULAR EM OMALIINAE.....	40
FIGURA 3-	DESENHO ESQUEMÁTICO MOSTRANDO O COMPLEXO GLANDULAR EM OMALIINAE.....	40
FIGURA 4-	DESENHO ESQUEMÁTICO EM VISTA DORSAL DO FINAL DO ABDOME DE UM EXEMPLAR DE OXYTELINAE MOSTRANDO O COMPLEXO GLANDULAR.....	42
FIGURA 5-	DESENHO ESQUEMÁTICO DO COMPLEXO GLANDULAR DA ESPÉCIE <i>Coprophilus striatulus</i> MOSTRANDO AS DUAS GLÂNDULAS DISTINTAS EM VISTA DORSAL	43
FIGURA 6-	DESENHO ESQUEMÁTICO MOSTRANDO A POSIÇÃO DAS GLÂNDULAS PIGIDIAIS EM STAPHYLININAE, COM BASE NA ESPÉCIE <i>Creophilus maxillosus</i> LINNAEUS.....	48
FIGURA 7-	DESENHO ESQUEMÁTICO DO COMPORTAMENTO DE FUGA EM <i>Stenus comma</i> LECONTE UTILIZANDO SUAS GLÂNDULAS PIGIDIAIS.....	51
FIGURA 8-	HIPÓTESE FILOGENÉTICA DA EVOLUÇÃO DE GLÂNDULAS PIGIDIAIS EM <i>Stenus</i>	53

LISTA DE FIGURAS
CAPÍTULO I: PARTE 2

FIGURA 1-	DESENHO ESQUEMÁTICO EM FACE DORSAL DA GLÂNDULA TERGAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i>	80
FIGURA 2-	CROMATOGRÁFO MOSTRANDO OS ONZE COMPOSTOS IDENTIFICADOS PARA <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i>	85
FIGURA 3-	PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO DOS COMPOSTOS DO EXTRATO (7,8 E 9) E SEUS DERIVADOS DO DMDS.	86
FIGURA 4-	ESQUEMA MOSTRANDO A SÍNTESE DOS ALCENOS 3, 7 E 8.....	86
FIGURA 5-	GRÁFICO MOSTRANDO OS RESULTADOS DOS BIOENSAIOS UTILIZANDO SECREÇÕES DAS GLÂNDULAS TERGAIS DE FÊMEAS NOS MACHOS.....	89
FIGURA 6-	GRÁFICO MOSTRANDO OS RESULTADOS DOS BIOENSAIOS UTILIZANDO SECREÇÕES DAS GLÂNDULAS TERGAIS DE MACHOS NOS MACHOS	90
FIGURA 7-	SEQUÊNCIA DO COMPORTAMENTO DE CÓPULA EM <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i>	91
FIGURA 8-	ESPECTRO DE MASSAS E INFRAVERMELHO DO COMPOSTO DECANO (1)	99
FIGURA 9-	ESPECTRO DE MASSAS E INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 2-METILCICLOHEXA-2,5-DIENO-1,4-DIONA (2)	100
FIGURA 10-	ESPECTRO DE MASSAS, INFRAVERMELHO E DMDS DO COMPOSTO (Z) UNDEC- 4-ENO (3)	101
FIGURA 11-	ESPECTRO DE MASSAS E INFRAVERMELHO DO COMPOSTO UNDECANO (4).....	102
FIGURA 12-	ESPECTRO DE MASSAS E INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 2-METOXI-3-METIL-1,4-BENZOQUINONA (5).....	103

FIGURA 13- ESPECTRO DE MASSAS E INFRAVERMELHO DO COMPOSTO DODECANO (6)	104
FIGURA 14- ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DOS COMPOSTOS (Z)-TRIDEC-4- ENO (7) E (Z)-TRIDEC-6-ENO (8).....	105
FIGURA 15- ESPECTRO DE MASSAS E INFRAVERMELHO DO COMPOSTO TRIDECANO (9)	106
FIGURA 16- ESPECTRO DE MASSAS E INFRAVERMELHO DO COMPOSTO DODECANAL (10).....	107
FIGURA 17- ESPECTRO DE MASSAS E INFRAVERMELHO DO COMPOSTO (Z) TETRADEC-9-ENAL (11).	108

LISTA DE FIGURAS
CAPÍTULO I: PARTE 3

FIGURA 1-	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DOS OVOS DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i>	119
FIGURA 2-	PRIMEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA DORSAL	119
FIGURA 3-	PRIMEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA DORSAL AUMENTADA	119
FIGURA 4-	PRIMEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA VENTRAL	119
FIGURA 5-	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA CABEÇA DO PRIMEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA DORSAL	120
FIGURA 6-	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA CABEÇA DO PRIMEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA LATERAL	121
FIGURA 7-	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA CABEÇA DO PRIMEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA DORSAL	121
FIGURA 8-	MANDÍBULA ESQUERDA DO PRIMEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA DORSAL	122
FIGURA 9-	PRONOTO DO PRIMEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara</i> <i>pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA DORSAL	122
FIGURA 10-	PERNAS DO PRIMEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara</i> <i>pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA LATERAL	123
FIGURA 11-	ABDOME DO PRIMEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara</i> <i>pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA VENTRAL	123
FIGURA 12-	SEGUNDO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA DORSAL	124

FIGURA 13-	SEGUNDO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA DORSAL AUMENTADA.....	124
FIGURA 14-	SEGUNDO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA VENTRAL	124
FIGURA 15-	SEGUNDO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA VENTRAL AUMENTADA	124
FIGURA 16-	CABEÇA DO SEGUNDO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara</i> <i>pseudochrysorrhoea</i> VISTA DORSAL	125
FIGURA 17-	CABEÇA DO SEGUNDO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara</i> EM VISTA VENTRAL	125
FIGURA 18-	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA CABEÇA DO SEGUNDO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA VENTRAL	126
FIGURA 19-	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA MANDÍBULA DO SEGUNDO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA VENTRAL	126
FIGURA 20-	PRONOTO DO SEGUNDO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara</i> <i>pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA DORSAL.....	126
FIGURA 21-	MESONOTO DO SEGUNDO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara</i> <i>pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA DORSAL.....	1276
FIGURA 22-	METANOTO DO SEGUNDO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara</i> <i>pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA DORSAL.....	126
FIGURA 23-	ABDOME DO SEGUNDO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara</i> <i>pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA VENTRAL.	127
FIGURA 24-	TERCEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA DORSAL	127
FIGURA 25-	TERCEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA DORSAL AUMENTADA	127
FIGURA 26-	TERCEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA VENTRAL	127

FIGURA 27- TERCEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA VENTRAL AUMENTADA	127
FIGURA 28- CABEÇA DO TERCEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara</i> <i>pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA DORSAL	128
FIGURA 29- CABEÇA DO TERCEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara</i> <i>pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA VENTRAL	128
FIGURA 30- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA CABEÇA DO TERCEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA VENTRAL	129
FIGURA 31- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA MANDÍBULA DO TERCEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA VENTRAL	129
FIGURA 32- ABDOME DO TERCEIRO ÍNSTAR LARVAL DE <i>Aleochara</i> <i>pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA VENTRAL.	129
FIGURA 33- PUPA DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA DORSAL.	130
FIGURA 34- PUPA DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA VENTRAL	130
FIGURA 35- PUPA DE <i>Aleochara pseudochrysorrhoea</i> EM VISTA LATERAL.....	130

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

FIGURA 1- Gráfico mostrando os resultados dos experimentos de túnel de vento 1 e 2... 138

FIGURA 1- Gráfico mostrando os resultados dos experimentos de túnel de vento 3 e 4... 138

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO III

- FIGURA 1- CROMATOGRAMA MOSTRANDO OS QUATRO COMPOSTOS SEXO ESPECÍFICOS DO MACHO DE *Pygiopachymerus lineola*. 152
- FIGURA 2- ESPECTRO DE MASSAS DOS QUATRO COMPOSTOS SEXO ESPECÍFICOS DO MACHO DE *Pygiopachymerus lineola*. 153
- FIGURA 3- PERFIL DE LIBERAÇÃO DO FEROMÔNIO SEXUAL EM *Pygiopachymerus lineola* DURANTE AS HORAS DA FOTOFASE 154
- FIGURA 4- RITMO CIRCADIANO DE *Pygiopachymerus lineola*. 154
- FIGURA 5- COMPARAÇÃO DO RITMO CIRCADIANO ENTRE MACHOS E FÊMEAS DE *Pygiopachymerus lineola* DURANTE A ESCOTOFASE..... 155
- FIGURA 6- COMPARAÇÃO DO RITMO CIRCADIANO ENTRE MACHOS E FÊMEAS DE *Pygiopachymerus lineola* DURANTE A FOTOTOFASE. 155

LISTA DE TABELAS
CAPÍTULO I: PARTE 2

TABELA 1- QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NAS
GLÂNDULAS TERGAIS DE *Aleochara pseudochrysorrhoea*..... 87

LISTA DE TABELAS
CAPÍTULO I: PARTE 3

TABELA 1- PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE OS ÍNSTARES LARVAIS EM
Aleochara pseudochrysorrhoea. 117

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

TABELA 1-	RESULTADO DOS EXPERIMENTOS EM TÚNEL DE VENTO REALIZADOS COM MACHOS DE <i>Diatraea saccharalis</i>	139
-----------	--	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

TABELA 1-	RESULTADO DO BIENSAIOS EM OLFATÔMETRO EM Y NA ESPÉCIE <i>Pygiopachymerus lineola</i>	156
-----------	---	-----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	26
REFERÊNCIAS	30
CAPITULO I: PARTE 1	32
RESUMO	33
ABSTRACT	34
1. INTRODUÇÃO	35
2. MATERIAL E MÉTODOS	36
3. RESULTADOS	36
3.1. ALEOCHARINAE FLEMING	36
3.1.1 Glândula tergal: compostos e funções associadas	37
3.1.2 Ecologia química na reprodução: atraindo parceiros para cópula	38
3.1.3 Um estranho no ninho: mimetismo químico em Aleocharinae	39
3.2 OMALIINAE MACLEAY	41
3.3 OXYTELINAE FLEMING	42
3.4 PAEDERINAE FLEMING.....	46
3.5 PROTEININAE ERICHSON.....	47
3.6. PSELAPHINAE LATREILLE	47
3.7 STAPHYLININAE LATREILLE.....	48
3.8 STENINAE MACLEAY	51
3.9 TACHYPORINAE MACLEAY	54
4. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICE	64
CAPÍTULO I: PARTE 2	76
RESUMO	77
ABSTRACT	78
1. INTRODUCTION	79
2. EXPERIMENTAL	80
2.1 LABORATORY CULTURES	80
2.2 TERGAL GLAND SECRETION EXTRACTION	80

2.3 CHEMICAL ANALYSES	81
2.3.1 MICRO-DERIVATIZATION	82
2.3.1.1 METHYLTHIOLATION	82
2.4 STRUCTURAL CONFIRMATION	82
2.5 SYNTHESIS	82
2.6 MATING BEHAVIOR SEQUENCE DESCRIPTION	84
2.7 BIOASSAYS	84
2.8 STATISTICAL ANALYSIS	85
3. RESULTS	85
3.1 CHEMICAL ANALYSIS OF TERGAL GLAND SECRETION	85
3.2 MALE GRASPING RESPONSE IN DIFFERENT CONCENTRATION OF TGS	88
3.3 MATING BEHAVIOR SEQUENCE	91
4. DISCUSSION	93
5. CONCLUSION	95
REFERENCES	96
APÊNDICE	100
CAPÍTULO I: PARTE 3	110
RESUMO	111
ABSTRACT	112
1. INTRODUCTION	113
2. MATERIAL AND METHODS	113
2.1 MORPHOLOGY	114
3. RESULTS	114
3.1 DIAGNOSIS	114
3.2 DESCRIPTIONS	115
REFERENCES	119
FIGURES	120
CAPÍTULO II	132
RESUMO	133
ABSTRACT	134
1. BACKGROUND	135
2. MATERIAL AND METHODS	136

2.1 INSECTS REARING	136
2.2 PHEROMONE EXTRACTION	136
2.3 SYNTHETIC STANDARDS	136
2.4 FLIGHT TUNNEL ASSAYS	136
2.5 STATISTICAL ANALYSIS	137
3. RESULTS	138
4. DISCUSSION	141
5. CONCLUSIONS	142
REFERENCES	144
CAPÍTULO III	146
RESUMO	147
ABSTRACT	148
1. INTRODUCTION	149
2. MATERIAL AND METHODS	150
2.1 INSECT COLLECTION	150
2.2 VOLATILE COLLECTION	150
2.3 PHEROMONE PRODUCTION DURING THE CIRCADIAN RHYTHM.....	150
2.4 CHEMICAL ANALYSES OF THE EXTRACTS	151
2.5 BIOASSAYS	151
2.6 CIRCADIAN RHYTHM.....	152
2.7 STATISTICAL ANALYSIS	152
3. RESULTS	152
3.1 EXTRACT ANALYSIS OF <i>PYGIOPACHYMERUS LINEOLA</i>	152
3.2 QUANTIFICATION OF THE PHEROMONE COMPONENTS	153
3.3 CIRCADIAN RHYTHM.....	155
3.4 Y-TUBE OLFACTOMETER ASSAYS	156
4. DISCUSSION	157
5. CONCLUSIONS	159
REFERENCES	160
CONSIDERAÇÕES FINAIS	163

INTRODUÇÃO GERAL

Em 1866 o naturalista alemão Ernst Haeckel definiu ecologia como a ciência que estuda as interações entre organismos e o meio ambiente em que vivem (Stiling, 1996; Trigo *et al.*, 2000). Em uma definição mais recente, ecologia pode ser definida como o estudo da abundância e distribuição dos organismos e das interações entre organismos que determinam sua distribuição e abundância (Begon *et al.*, 2006).

Ecologia química é um campo de estudo multidisciplinar que objetiva compreender a origem, função e a significância de compostos naturais que medeiam interações entre os organismos (Tillman, 1999; Trigo *et al.*, 2000; Bergström, 2007).

Assim como outros animais, os insetos possuem uma gama de interações ecológicas com o ambiente e com outros organismos, sendo a comunicação através de emissão de voláteis uma das mais importantes. Esses compostos voláteis agem como gatilhos de reações comportamentais específicas no indivíduo receptor da mensagem química. Em uma nomenclatura mais generalista, essas substâncias são denominadas semioquímicos (Zarbin *et al.*, 2009). Genericamente este termo abrange os compostos químicos envolvidos nas interações intraespecíficas (feromônios) e interespecíficas (aleloquímicos) dos insetos (Leal, 2005).

Os estudos com insetos em ecologia química têm como marco central o trabalho do químico alemão ganhador do prêmio Nobel de química, Adolf Butenandt (1903–1995), com seus estudos pioneiros envolvendo a mariposa *Bombyx mori* L. (bicho-da-seda). Durante 20 anos e com a extração de cerca de 500 mil glândulas abdominais de fêmeas, Butenandt conseguiu identificar e sintetizar o primeiro feromônio para insetos (*E, Z*)-hexadeca-10,12-dienal (*bombikol*) (Butenandt *et al.*, 1959; Bergström, 2007; Leal, 2014).

O termo feromônio foi introduzido por Karlson & Lüscher em 1959 (*pherein* = transferir, *hormon* = excitar). Feromônios são moléculas que evoluíram como sinal químico entre organismos da mesma espécie. Podem ser definidos como iniciadores, estimulando ou modulando respostas comportamentais imediatas e iniciando, estimulando ou modulando mudanças fisiológicas de longa duração (Wyatt, 2014).

Entre os insetos, vários tipos de feromônios são reconhecidos de acordo com os comportamentos que induzem (Jurenka, 2004). Os comportamentos mediados por feromônios incluem a atração do sexo oposto para o acasalamento (feromônios sexuais), a agregação de ambos os sexos a um local específico para alimentação, a proteção contra predadores e/ou acasalamento (feromônios de agregação) e a demarcação ou a formação de trilhas (feromônios

de trilha). Além desses, os insetos sociais utilizam uma variedade de feromônios para regular as atividades na colônia (Schowalter, 2006).

Desde a identificação do feromônio sexual em *Bombix mori* por Butenandt *et al.* (1959), o interesse na identificação química de compostos voláteis liberados por insetos cresceu enormemente. Cerca de 7 mil espécies tiveram semioquímicos identificados (Leal, 2014). Dentro deste panorama, os insetos considerados pragas de importância econômica são os que tiveram mais estudos relacionados à ecologia química, devido principalmente a aplicabilidade de semioquímicos nos programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Bento *et al.*, 2016). Entretanto, estudos sobre ecologia química em insetos não considerados pragas são ferramentas importantes para conservação, taxonomia e filogenia das espécies, além de serem ferramentas extremamente úteis na correta identificação de espécies através de perfis cuticulares, que podem ser consideradas ferramentas rápidas e baratas para identificação, principalmente de espécies crípticas (Yew & Chung, 2015).

Estudos de ecologia química em insetos tem como passo inicial a extração de voláteis oriundos dos insetos. As extrações geralmente são realizadas por meio de sistemas de aeração ou extração direta, como, por exemplo, a extração direta de glândulas feromonais em mariposas (Zarbin *et al.*, 1999). A partir da coleta dos voláteis faz-se necessária a identificação química dos compostos bioativos, para isso, a técnica mais comumente utilizada é a cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas (CG/EM).

A técnica de cromatografia tem origem no trabalho de 1906 do botânico russo Mikhail Semenovich Tswett, que ao descrever suas experiências na separação de compostos de folhas, empregou pela primeira vez o termo cromatografia. Seu estudo, utilizando éter de petróleo através de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio, na qual se adicionou o extrato de folhas, resultou na separação dos componentes em faixas coloridas. Provavelmente essa experiência deu origem ao termo cromatografia (*chrom* = cor e *graphie* = escrita), podendo levar à errônea ideia de que o processo seja dependente da cor (Degani *et al.*, 1998).

Cromatografia é um método de separação físico-químico baseado na interação diferencial dos componentes de uma mistura que ocorre devido às diferentes interações sofridas pelos compostos em duas fases distintas do processo, a fase móvel e a fase estacionária. Essa técnica pode ser associada à diferentes sistemas de detecção, o acoplamento de um cromatógrafo a um espectro de massas é uma das técnicas mais utilizadas em ecologia química de insetos. Essa técnica combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação

estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (Degani *et al.*, 1998; Vékey, 2001; Chiaradia *et al.*, 2008).

Esta técnica é bastante atrativa devido ao seu alto poder de resolução e por permitir a detecção de compostos voláteis em escalas muito pequenas como nano e picograma. A principal limitação desta técnica é a necessidade que os compostos sejam voláteis ou termicamente estáveis (Degani *et al.*, 1998; Stein, 1999).

Com relação a percepção dos insetos aos odores (como feromônios), a técnica mais empregada é a eletroantenografia associada à cromatografia gasosa (ECG). Esta é uma técnica que usa as antenas dos insetos como detector, tendo como origem o trabalho de Schneider (1963). Trabalhando com o sistema eletrofisiológico olfativo de *Bombyx mori* L., Schneider percebeu que havia pequenas flutuações de voltagem entre a ponta e a base da antena quando as antenas eram estimuladas com feromônio. Schneider demonstrou que o potencial de recepção do inseto ao seu feromônio poderia ser registrado utilizando-se uma antena isolada, posicionada entre dois microeletrodos capilares conectados a um amplificador e a um registrador (Parra-Pedrazzoli, 2006).

A simples utilização da eletroantenografia sem um método de separação de compostos, como a cromatografia, em geral não apresenta grandes vantagens, uma vez que não é possível especificar quais compostos realmente afetam o comportamento biológico do inseto (Parra-Pedrazzoli, 2006). Uma vez associada à cromatografia gasosa, esse método se torna extremamente eficiente e eficaz para a detecção de feromônios, pois alia a especificidade e sensibilidade da eletroantenografia com a enorme capacidade analítica de separação de compostos da cromatografia (Moorhouse *et al.*, 1969).

Zarbin (2001) argumenta que são raros os trabalhos que não empregam a técnica de eletroantenografia na elucidação estrutural de compostos, principalmente, devido ao fato de os compostos registrados pela eletroantenografia geralmente estarem presentes em quantidades extremamente baixas, o que torna bastante inviável sua detecção por outros métodos de análise.

Tendo em vista a carência de estudo de ecologia química e suas influências no comportamento das espécies de Staphylinidae e Bruchinae e a importância econômica e ambiental da praga da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*. Esta tese teve como objetivo geral estudar a comunicação química e os aspectos biológicos nas espécies *Aleochara pseudochrysorrhoea*, *Diatraea saccharalis* e *Pygiopachymerus lineola*. Devido a grandes diferenças entre os organismos estudados e das características dos estudos, a tese foi organizada em forma de parte e capítulos. A tese está dividida em três capítulos, sendo o capítulo I

subdividido em três partes. Parte 1, compreende a revisão da literatura sobre ecologia química dentro da família Staphylinidae. Parte 2, identificação química da secreção da glândula tergal de *Aleochara pseudochrysorrhoea*, bem como o estudo de sua função biológica. Parte 3, descrição dos estágios imaturos de *Aleochara pseudochrysorrhoea*. O capítulo II compreende o estudo da atratividade de uma mistura feromonal de quatro compostos na broca-da-cana *Diatraea saccharalis* em experimentos realizados em túnel de vento. O capítulo III compreende o estudo de compostos sexo específicos liberados por machos de *Pygiopachymerus lineola* bem como estudos do ritmo circadiano e taxa de liberação de feromônio.

REFERÊNCIAS

- BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. Ecology: From individuals to ecosystems ,(4th ed.). **Blackwell**. ISBN 1405111178, 2006.
- BENTO, J. M. S.; PARRA, J. R. P.; MIRANDA, S. H. G.; ADAMI, A. C. O.; VILELA, E. F.; LEAL, W. S. How much is a pheromone worth? **F1000Research**, v. 5 n. 1763, p.1-13, 2016
- BERGSTRÖM, G. Chemical ecology = chemistry + ecology!. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 12, p. 2305–2323, 2007.
- BUTENANDT, A.; BECKMANN, R.; STAMM, D.; HECKER, E. Uber den sexual-lockstoff des seidenspinners *Bombyx mori* - Reindarstellung und konstitution. **Zeitschrift Fur Naturforschung Part B-Chemie Biochemie Biophysik Biologie Und Verwandten Gebiete**, v.14, p. 283-284, 1959.
- CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIN, C. S. F. O ESTADO DA ARTE DA CROMATOGRAFIA ASSOCIADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA ANÁLISE DE COMPOSTOS TÓXICOS EM ALIMENTOS. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.
- DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola**, v.7, p. 21-25, 1998.
- JURENKA, R. Insect Pheromone Biosynthesis. **The chemistry of pheromones and other semiochemicals**, v. 239, p. 97–132, 2004.
- KARLSON, P.; LÜSCHER, M. ‘Pheromones’: a new term for a class of biologically active substances. **Nature**, v. 183, n. 4653, p. 55, 1959.
- LEAL, W. S. Pheromone Reception. In: Schulz, S. (Ed.). The chemistry of pheromones and other semiochemicals II: topics in current chemistry. Berlin: **Springer**, v. 1, p. 1-36, 2005.
- LEAL, W. Deciphering the RosettaStone of Insect Chemical Communication. **American Entomologist**, v. 60, p. 223-230 2014.
- PARRA-PEDRAZZOLI, A. L. Isolamento, identificação, síntese e avaliação de campo do feromônio sexual do minador-dos-citros, *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 Lepidoptera: Gracillariidae. 82 f. Tese (**Doutorado em Ciências. Área de concentração: Entomologia**) – Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Piracicaba, São Paulo. 2006.
- SCHOWALTER, T. D. Insect ecology: an ecosystem approach. San Diego, California, USA: **Elsevier**, p. 471, 2006.

SCHNEIDER, D. Eletrophysiological investigation of insects olfaction. In: Zotterman, I.Y. (Ed.) Olfaction and Taste. **Oxford: Pergamon Press**, p. 85-103, 1963.

STEIN, S. E. An Integrated Method for Spectrum Extraction and Compound Identification from Gas Chromatography/Mass Spectrometry Data. **Journal of America Society of Mass Spectrom**, v. 10, p. 770-781, 1999.

STILING, P. D. Ecology, Theories and Applications. **Prentice Hall**, New Jersey, 1996.

TRIGO, J.R.; BITTRICH, V.; AMARAL, M. C. Ecologia Química, 2000, Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2000/03/18/ecologia-quimica/>>.

TILLMAN, A. J.; SEYBOLD, S. J.; JURENKA, R. A.; BLOMQUIST, G. J. Insect pheromones—an overview of biosynthesis and endocrine regulation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, p. 481-514, 1999.

VÉKEY, K. J. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of chromatography**, v. 921, p. 227, 2001.

WYATT, T. D. Pheromones and Animal Behavior: Chemical Signals and Signature Mixes. Second Edition. **Cambridge, UK: Cambridge University Press**, 2014.

YEW, J. Y.; CHUNG, H. Insect pheromones: An overview of function, form, and discovery. **Progress in Lipid Research**. v. 59, p. 88–105, 2015.

ZARBIN, P. H. G. Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos. In: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed). Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação. Ribeirão Preto: **Holos**, p. 45-50, 2001.

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

CAPITULO I: PARTE 1

**REVISÃO SOBRE ECOLOGIA QUÍMICA DA FAMÍLIA STAPHYLINIDAE
LATREILLE (COLEOPTERA): COMPOSTOS QUÍMICOS E SUAS INFLUÊNCIAS
NO COMPORTAMENTO**

RESUMO

Na sua maioria, os estudos de ecologia química abordam insetos que são considerados pragas agrícolas. Entretanto, estudos com insetos que não são considerados pragas também são importantes, pois fornecem uma visão mais geral dos processos químicos e bioquímicos envolvidos na produção dos diversos compostos, além de elucidar suas estruturas químicas. Além disso, estudos de ecologia química em grandes grupos de espécies podem gerar caracteres importantes que podem ser utilizados em estudos filogenéticos. Staphylinidae destaca-se por ser a maior família conhecida do reino animal, com mais de 58 mil espécies descritas alocadas em 33 subfamílias. Muito do sucesso evolutivo dessa família pode estar relacionado com o fato do corpo ser alongado, flexível e curtos, o que permitiu que esses indivíduos colonizassem, de forma muito eficiente, interstícios no solo, serapilheira e fungos. Em contrapartida, a presença de élitros curtos deixa o abdome exposto ao ataque de predadores e, devido a esta pressão seletiva, vários complexos glandulares defensivos evoluíram de forma independente e diferem não somente no local de produção, como também com relação ao tipo de composto químico liberado. A ecologia química de Staphylinidae, principalmente com relação aos compostos feromoniais, ainda é um campo de estudo incipiente. Com base no banco de dados *online* Pherobase, apenas uma espécie teve compostos de origem feromonal identificados (*Aleochara curtula* Goeze). Portanto, esta revisão teve como objetivo sumarizar todo o conhecimento disponível na literatura relativo à ecologia química de Staphylinidae e com isso gerar subsídios para futuros trabalhos com essa enorme família de besouro. A busca por artigos e compostos químicos liberados por estafilínídeos ocorreu principalmente no banco de dados *online* Pherobase. Nesse banco de dados estão depositados os compostos químicos que foram identificados para as espécies bem como suas funções (defesa, atração ou feromônio). Ao total foram analisados 51 artigos que tratam da ecologia química de nove subfamílias distintas (Aleocharinae, Omaliinae, Oxytelinae, Paederinae, Proteininae, Pselaphinae, Staphylininae, Steninae e Tachyporinae), que alocam 55 gêneros e 134 espécies. Dentro da família existe uma grande variação, entre as diversas subfamílias, com relação aos tipos de compostos liberados bem como seu sítio de produção. A grande maioria dos compostos identificados são de origem defensiva entre eles: quinonas (Aleocharinae e Oxytelinae), iridoides (Staphylininae, Xantholininae), ácidos e alcanos (Omaliinae, Proteininae) ou compostos altamente especializados com *Penderin* (Paederinae) ou *Stenusine* (Stenusinae).

Palavras chave: Ecologia química. Staphylinidae. Compostos defensivos. Feromônio. Comportamento.

ABSTRACT

In general, most of Chemical Ecology studies are based on insect pests, but studies regarding nonpest insects are very important as well, this kind of work can provide a panoramic view of chemical process, biochemical evolved into the production of many compounds and provides new chemical molecules. Besides that, chemical ecology study in many insect groups can provide new important phylogenetic characters that could be helpful on the phylogeny for many taxa. Staphylinidae is the biggest family in the animal kingdom with more than 58 thousand species in 33 subfamilies. The evolutionary success of this family could be related to the body morphology, the short elytra, elongated and flexible abdomen allow this species effective colonize soil interstices and fungus. On the other hand, short elytra let the abdomen exposed to predator attack, because of that, almost all rove beetle subfamilies have independently evolved abdominal defensive glands that differ not only in their site and morphology but also with regard to their secretion chemistry. Staphylinidae chemical ecology, mostly regarding on pheromone study is a relatively unexplored field. Based on data available on Pherobase, only one species had pheromone compounds identified (*Aleochara curtula* Goeze). Therefore, the aim of this review is to provide a detailed summary of all knowledge available for the Staphylinidae chemical ecology, providing basis for future works. The search for articles and chemical compounds released by Staphylinidae was mostly through the online database Pherobase. Were analyzed 51 articles, which deal with chemical ecology in nine Staphylinidae subfamily (Aleocharinae, Omaliinae, Oxytelinae, Paederinae, Proteininae, Pselaphinae, Staphylininae, Steninae and Tachyporinae), inside 55 genus and 134 species. There is a lot of variation inside the many Staphylinidae subfamily, with respect to their chemical ecology, that vary not only by glands morphology, but also with regard to their chemistry secretion. While some of these defense systems are based upon quinones (Aleocharinae, Oxytelinae) or iridoids (Staphylininae) as major compounds, other staphylinid taxa use predominantly acids and alkenals (Omaliinae, Proteininae) or highly specialized substances such as the Penderin (Paederinae) or Stenusin (Steninae) in their secretions.

Keywords: Chemical ecology. Staphylinidae. Defensive compounds. Pheromone. Behavior.

1. INTRODUÇÃO

Staphylinidae Latreille (Staphylinidae, como definido por Grebennikov & Newton, 2009; Bouchard *et al.*, 2011) destaca-se como sendo a mais diversa família dentro de Coleoptera e a maior família de animal conhecida, com mais de 58 mil espécies descritas entre viventes e fósseis e alocadas em 33 subfamílias (Bouchard *et al.*, 2011; Solodovnikov *et al.*, 2013). Podem ser encontrados em uma grande diversidade de ambientes tanto terrestres quanto em zonas intercostais, mas em geral tendem a preferir ambientes mais úmidos (Navarrete-Heredia *et al.*, 2002).

A família Staphylinidae é a maior radiação dentro de Insecta. Muito desse sucesso evolutivo pode estar relacionado ao seu corpo alongado, élitros reduzidos e abdome flexível, o que permitiu aos indivíduos dessa família colonizar de forma muito eficiente interstícios no solo, serapilheira e fungos (Steidle & Dettner, 1993). Apesar das grandes vantagens conferidas pelos élitros curtos e abdome flexível, os estafilinídeos apresentam a desvantagem de terem seu abdome totalmente exposto aos ataques de predadores. Como resultado dessa pressão seletiva, na maioria das subfamílias de Staphylinidae, glândulas defensivas abdominais evoluíram de forma independente (Steidle & Dettner, 1993). Essa pressão seletiva fica evidente quando são observadas espécies que vivem como inquilinas de formigas ou cupins. Nestas espécies as glândulas defensivas são gradualmente ou totalmente perdidas (Pasteels, 1968; Shower & Kistner, 1977; Kistner, 1979; Steidle & Dettner, 1993).

Apesar de uma enorme diversidade de espécies descritas, a ecologia química de Staphylinidae é um campo pouco explorado (principalmente com relação a compostos feromonais), provavelmente devido ao fato de as espécies não serem pragas agrícolas ou de produtos estocados. No banco de dados *online Pherobase* (El-Sayed, 2016), estão descritos compostos (defesa, atração, feromônio etc.) para apenas 134 espécies, o que corresponde a cerca de 4% do total de espécies presentes na família. Desse total, apenas *Aleochara curtula* Goeze, teve compostos feromonais identificados.

Embora as espécies de Staphylinidae não sejam consideradas importantes pragas agrícolas, espécies como as do gênero *Aleochara*, por exemplo, desempenham papéis importantes no seu ecossistema, seja nos processos de decomposição de cadáveres, na sucessão ecológica, ou ainda, como importantes predadores de larvas de moscas. Além disso, estudos que abordam a morfologia de glândulas e componentes químicos podem gerar uma nova gama de caracteres que podem ser usados em estudos filogenéticos (Steidle & Dettner, 1993).

Desta forma, esta revisão teve como objetivo sumarizar todo o conhecimento disponível na literatura relativo à ecologia química de Staphylinidae e com isso gerar subsídios para futuros trabalhos com essa enorme família de besouro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A busca por artigos e compostos químicos liberados por estafilínídeos ocorreu principalmente no banco de dados *online Pherobase* (El-Sayed, 2016). Neste banco de dados estão depositados os compostos químicos para as espécies, bem como suas funções (defesa, atração ou feromônio). Todos os compostos encontrados estão discriminados em forma de lista (Apêndice). Devido à enorme variação de comportamentos e dos locais do corpo onde os compostos são produzidos e liberados, optou-se aqui por separar a revisão em tópicos de acordo com a subfamília.

3. RESULTADOS

Ao total foram analisados 51 artigos que tratam da ecologia química de Staphylinidae, esses artigos abordam 134 espécies, pertencentes a 55 gêneros, alocados em nove subfamílias distintas: Aleocharinae, Omaliinae, Oxytelinae, Paederinae, Proteininae, Pselaphinae, Staphylininae, Steninae e Tachyporinae.

3.1. ALEOCHARINAE FLEMING

Aleocharinae é a mais numerosa subfamília de Staphylinidae com mais de 13 mil espécies descritas alocadas em 51 tribos e 1700 gêneros e apresenta uma distribuição mundial ocupando praticamente todos os habitats terrestres (Newton *et al.*, 2000; Ashe, 2002; Thayer, 2005; Song & Ahn, 2013). São uns dos predadores generalistas mais abundantes no folhíço, excrementos, material vegetal em decomposição e carcaças de animais. Algumas espécies têm hábitos altamente especializados como inquilinos em ninhos de formigas e cupins e como parasitoides de pupários de dípteros ciclórrafos (Navarrete-Herdia *et al.*, 2002).

Em Staphylinidae, as glândulas defensivas abdominais surgiram várias vezes de forma independente (Araujo, 1978). Tipicamente, os compostos defensivos liberados por estafilínídeos

são originários de glândulas conhecidas com pigidiais. O termo glândulas pigidias se refere às glândulas pareadas que são encontradas próximas ao ápice do abdome (Brand *et al.*, 1973).

A maioria das espécies de Aleocharinae possui um complexo glandular chamado glândula tergal (essa glândula pode estar reduzida ou ausente em espécies inquilinas de formigas ou cupins), esse complexo está localizado na margem anterior do tergito abdominal VII nos adultos (Fig.1) (Steidle & Dettner, 1993; Navarrete-Heredia *et al.*, 2002). Essa glândula é utilizada quando as espécies de aleocaríneos são perturbadas, os indivíduos então curvam seu abdome em direção ao agressor e liberam secreções oriundas da glândula tergal (Steidle & Dettner, 1993). Essa estrutura glandular não é homóloga a nenhuma outra conhecida para a família Staphylinidae, sendo assim exclusiva da subfamília Aleocharinae (Brand *et al.*, 1973).

3.1.1 Glândula Tergal: compostos e funções associadas

A glândula tergal é um reservatório glandular de forma bilobada, formada por uma invaginação das membranas intersegmentares e está localizada entre o sexto e o sétimo tergito abdominal (Fig.1) (Peschke & Metzler, 1982). Os compostos liberados por essa glândula têm sido estudados e demonstraram possuir funções defensivas (Jordan, 1913; Pasteels, 1968; Blum *et al.*, 1971; Brand *et al.*, 1973; Gnanasuderam *et al.*, 1981; Peschke & Metzler, 1982; Peschke, 1983; Steidle & Dettner, 1993). As secreções liberadas por espécies da subfamília Aleocharinae podem causar manchas vermelhas ou marrons na pele de humanos, possuem uma coloração amarela e odor característico de compostos cáusticos, devido a grande quantidade de quinonas presentes nessas secreções (Peschke & Metzler, 1982). As secreções presentes na glândula tergal têm sido estudadas quimicamente em várias espécies e os principais compostos químicos relatados para essa estrutura são, na sua maioria, hidrocarbonetos alifáticos, aldeídos, quinonas e ésteres (Lista I, Apêndice).

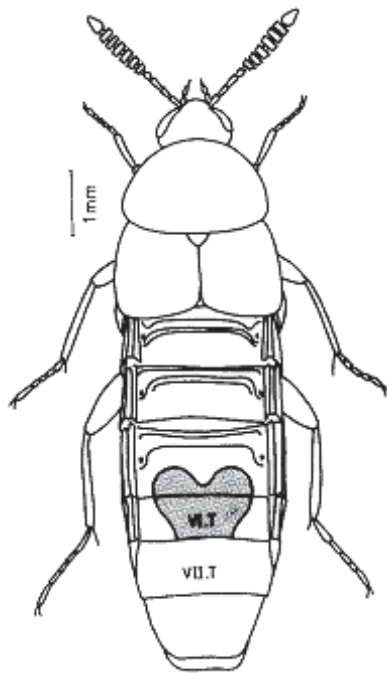


Figura 1. Desenho esquemático em face dorsal de um indivíduo da subfamília Aleocharinae, destacando a glândula tergal. Fonte: Peschke & Metzler, 1982.

Os compostos químicos da classe das quinonas são os principais constituintes defensivos da glândula tergal das espécies de Aleocharinae, uma vez que ocorrem em todas as espécies estudadas quimicamente até agora. O composto 2-metil-1,4-benzoquinona é o mais representativo dentro das espécies de aleocaríneos, esse composto foi identificado em 19 das 26 espécies que tiveram estudos químicos relatados (Lista I, Apêndice). Esse tipo de composto parece ser bastante primitivo, tendo em vista que ocorre em vários outros grupos de artrópodes, como por exemplo, em glândulas odoríferas de Opiliones (Caetano & Machado, 2013; El Sayed, 2016).

3.1.2 Ecologia Química na Reprodução: atraindo parceiros para cópula

Algumas das mais importantes decisões na vida de um inseto são tomadas baseadas em compostos químicos como feromônios. Os feromônios são sinais químicos que desempenham papéis importantes na reprodução da maioria dos insetos, sendo sinais coespecíficos, que são utilizados para atração de pares para a cópula, indicam períodos reprodutivos e indicam aptidão reprodutiva (Yew & Chung, 2015).

Embora o comportamento de cópula tenha sido observado em várias espécies de Staphylinidae, pouco se sabe sobre a função de feromônios neste enorme grupo de espécies

(Peschke, 1978). Dentro da subfamília Aleocharinae apenas a espécie *Aleochara curtula* Goeze teve compostos feromonais identificados, como os ésteres (Z)-hexadec-9-enoato e hexadecanoato de isopropila (Pesch *et al.*, 1999).

Como mencionado anteriormente, a glândula tergal em aleocaríneos tem sido relatada como possuindo funções defensivas, mas, trabalhos realizados por Peschke (1986 e 1987) demonstraram que alguns compostos produzidos por essa glândula podem agir como estimulantes para a cópula, como o (Z)-tridec-4-eno, dodecanal e (Z)-tetradec-5-eno.

Alguns compostos químicos têm sido relatados na literatura como atrativos para alguns indivíduos dentro de Aleocharinae, como compostos produzidos por fungos das espécies *Fomitopsis pinicola* Karst e *Fomes fomentarius* L. (Faldt *et al.*, 1999). O composto formaldeído foi utilizado como isca atrativa em uma armadilha de interceptação de queda (Pittfal) por Pekár (2002) que coletou exemplares do gênero *Drusulla* sp.

3.1.3 Um Estranho no Ninho: mimetismo químico em Aleocharinae

Mimetismo pode ser caracterizado por espécies que imitam sinais (ex: sinais químicos), comportamentos ou cores de outra espécie. Mimercofilia é um termo que define espécies que vivem como hospedeiros em colônias de formigas. Para que esses indivíduos possam se integrar às colônias de formigas, inúmeros mecanismos têm evoluído como o mimetismo de características morfológicas, comportamentos e secreções químicas (Hollard & Deluis, 1982; Dettner & Liepert, 1994).

Insetos mimercófilos obtêm diversas vantagens por esse comportamento, como por exemplo, o acesso a vários tipos de recursos alimentares, proteção e condições climáticas favoráveis. No entanto, viver em colônias ou juntamente com formigas pode ser perigoso, pois as formigas tendem a ser bastante agressivas com indivíduos que não fazem parte da sua colônia, reconhecendo os membros da colônia por meio de sinais químicos (Holldobler & Wilson 1990; Yamaoka 1990; Howard 1993; Akino, 2002; Stoeffler *et al.*, 2007).

Várias espécies dentro da subfamília Aleocharinae podem ser encontradas associadas com formigas e, em alguns casos, esses indivíduos parecem ter conseguido quebrar o código de comunicação de seus hospedeiros tornando-se totalmente integrados a essas colônias (Holldoble, 1981).

O primeiro trabalho a demonstrar quimicamente o hábito mimercófilo em Aleocharinae foi o de Kistner & Blum (1971) que identificaram o feromônio de alarme da formiga *Lasius*

(*Dendrolasius) spathepus* (Wheeler) como sendo o aldeído citronelal (3,7-dimetiloct-6-enal) e demonstraram que aparentemente a espécie *Pella japonicus* (Sharp) é capaz de mimetizar esse composto para viver associada a essa espécie de formiga.

Trabalhando com espécies europeias do gênero *Pella*, Holldoble *et al.* (1981) não conseguiram identificar nas glândulas terçais secreções semelhantes às liberadas pelas glândulas labiais de formigas como *Lasius fuliginosus* Latreille (uma das glândulas responsáveis pela liberação de compostos feromonais em formigas). Entretanto, os autores ressaltam que foi encontrado nas secreções de *Pella* o composto undecano, que é um hidrocarboneto alifático de cadeia longa, comumente encontrado em glândulas de *Dofour*, que são glândulas conhecidas por liberarem compostos de alarme em formigas.

As formigas da espécie *L. fuliginosus* usam hidrocarbonetos cuticulares como meio de reconhecer quimicamente membros da colônia e para que outros insetos possam se tornar hospedeiros dessas colônias estes precisam imitar quimicamente esses compostos (Akino & Yamaoka, 2000). Em experimentos realizados em laboratório utilizando espécimes de *L. fuliginosus* das quais os aleocaríneos *Zyras comes* Wasmann são hospedeiros, Akino (2002) observou que operárias que entravam em contato com essa espécie não demonstravam comportamento agressivo com relação a esses indivíduos.

Análises de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas realizadas por Akino (2002) revelaram que *Zyras comes* tem um padrão de hidrocarbonetos idênticos a o de *L. fuliginosus*. Com base no padrão semelhante de hidrocarbonetos e em testes de agressividade realizados com membros da colônia de formigas e com a espécie de Aleocharinae, o autor sugere *Zyras comes* é capaz de imitar quimicamente os sinais químicos liberados pelas formigas *L. fuliginosus*. Baseando-se em análises químicas de laboratório e de campo, Stoeffler *et al.* (2003) demonstraram que as espécies mimercófilas *Pella funestus* Gravenhorst e *Pella humeralis* Gravenhorst também são capazes de imitar os feromônios da formiga *Lasius fuliginosus*.

As espécies mimercófilas *Zyras collaris* Paykull e *Zyras haworthi* Stephens tiveram as secreções de suas glândulas terçais investigadas quimicamente e demonstraram ser compostas pelos terpenos: α -pineno, β -pineno, mirceno e limoneno (Stoeffler *et al.*, 2013). Esse tipo de composto químico não foi identificado para nenhuma das outras 26 espécies de aleocaríneos que tiveram suas glândulas terçais investigadas quimicamente. Entretanto, os autores argumentam que como as espécies utilizadas no trabalho são extremamente raras, apenas um exemplar de cada espécie foi utilizado no estudo, e que com base na reduzida amostragem não se pode afirmar que esse é o padrão das secreções químicas para essas espécies.

Além disso, erros durante o processo de identificação podem acontecer, portanto, são necessários mais estudos para confirmar com precisão se esses compostos químicos realmente ocorrem nessas espécies.

3.2 OMALIINAE MACLEAY

As espécies dessa subfamília são em geral predadoras e tanto as larvas como os adultos podem ser encontrados em fungos, flores ou frutas em decomposição. A subfamília é composta por cerca de 1450 espécies alocadas em 117 gêneros (Steel, 1970; Thayer, 1985; Newton & Thayer, 1995; Newton *et al.*, 2000; Navarrete-Heredia *et al.*, 2002).

A maioria das espécies de Staphylinidae liberam algum tipo de secreção defensiva, principalmente da região posterior do abdome quando são molestadas. No caso da subfamília Omaliinae, as espécies liberam suas secreções defensivas através de glândulas presentes entre o sexto e o sétimo esternito abdominal (Fig. 2 e 3) (Klinger & Maschwitz, 1977).

A espécie *Eusphalerum longipenne* Erichson teve seu aparato glandular investigado (Klinger & Maschwitz, 1977) e através de técnicas de cromatografia gasosa os autores identificaram uma série de compostos, principalmente os aldeídos: hexanal, octanal, decanal, trans-hexenal, trans-octenal e trans-decenal. Os autores afirmaram que essas secreções são repelentes contra vários tipos de predadores, como formigas, aranhas e percevejos.

Trabalhando com 21 espécies de Omaliinae alocadas em 10 gêneros Dettner & Reissenweber (1991) conseguiram identificar 46 diferentes compostos defensivos (Lista II, Apêndice), sendo esses compostos pertencentes às seguintes classes: ácidos, aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, compostos aromáticos, hidrocarbonetos e terpenos. Após a realização de bioensaios, os autores argumentam que os ésteres presentes nas glândulas ajudam na penetração dos compostos tóxicos (como ácidos) em outros organismos e que os ácidos sozinhos não são compostos defensivos eficientes, necessitando de solventes para se tornarem irritantes.

Martikainen *et al.* (2001) utilizando armadilhas com o composto feromonal *S*- (+)- e *R*- (-)-6-metil-5-hepten-2-ol(sulcatol), presente nas espécies do gênero *Gnathotrichus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolotinae), coletaram a espécie *Hapalaraea melanocephala* Fabricius.

Fietz *et al.* (2002) trabalhando com a espécie *Eusphalerum minutum* Fabricius através de técnicas de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas, relataram a presença da toxina (+)-palasonina na hemolinfa desse inseto. Palasonina havia sido identificada

anteriormente apenas na espécie de arbusto *Butea frondosa* Koenig (Leguminaceae). Essa substância foi descrita como uma eficiente toxina contra vermes como lombrigas, oxiúros e vermes de cachorro (Mehtar & Parasar, 1966; Raj & Kurup, 1967).

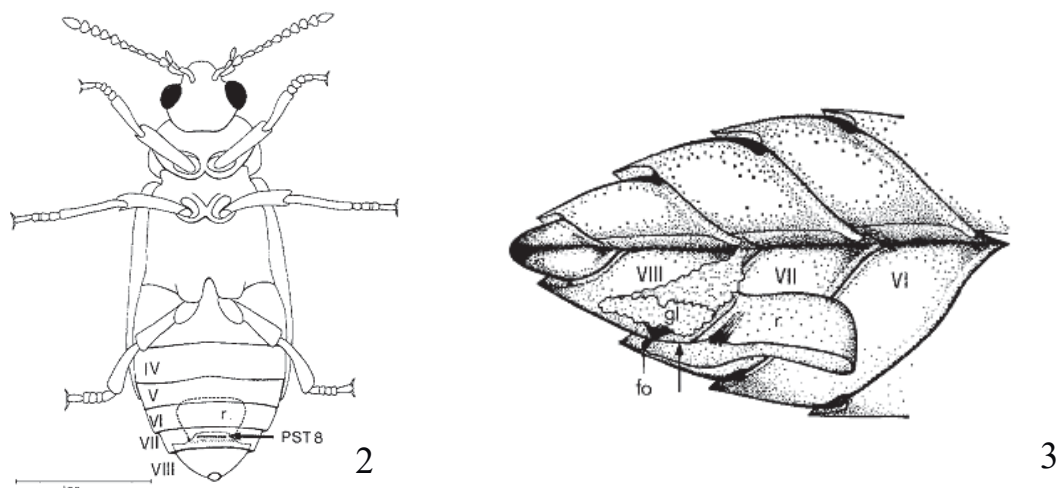


Figura 2. Desenho esquemáticos mostrando o complexo glandular em Omaliinae (Coleoptera: Staphylinidae) em vista ventral. Fonte: Klinger & Maschwitz (1977). Figura 3. Desenho esquemático do complexo glandular de Omaliinae em vista lateral. Abreviações: Números romanos indicam o número do segmento abdominal. PST8, projeção do oitavo esternito; r, reservatório; fo, dobra; gl, glândula. Fonte: Klinger & Maschwitz (1977).

3.3 OXYTELINAE FLEMING

A subfamília Oxytelinae é um dos grupos de espécies mais antigos dentro de Staphylinidae, estão descritas para esta família cerca 2000 espécies distribuídas mundialmente (Herman, 2001; Yue *et al.*, 2012). Dentro de Staphylinidae, espécies de Oxytelinae podem ser diferenciadas pela presença de sete esternitos abdominais (usualmente seis na maioria das espécies de Staphylinidae) e tergito IX com aberturas glandulares conspícuas. A maioria das espécies são saprófagas, com algumas espécies se alimentando de algas e diatomáceas (Herman, 1970; Navarrete-Heredia *et al.*, 2002).

As espécies pertencentes à subfamília Oxytelinae liberam secreções defensivas oriundas de glândulas ovais que se abrem entre os segmentos abdominais IX e X (Fig. 4) (Araujo, 1973; Happ & Happ, 1973; Dettner & Schwinger, 1982).

Estudando as secreções oriundas do complexo glandular das espécies *Bledius mandibularis* Erichson e *Bledius spectabilis* Kraatz, Wheller *et al.* (1972) com a técnica de

cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas identificaram como composto majoritário a lactona dodecan-4-olida. Além deste composto majoritário outros compostos como terpenos, benzoquinona e undeceno foram identificados (Lista III, Apêndice). Com base em observações do comportamento verificou-se que as espécies de *Bledius* liberam secreções quando próximas a formigas ou outras espécies de Oxytelinae. Desta forma, os autores sugerem que os compostos químicos presentes nas glândulas das espécies de *Bledius* são compostos de natureza defensiva.

Bledius spectabilis Kraatz, *Platystethus arenarius* Fourcr e *Oxytelus piceus* L tiveram suas glândulas investigadas quimicamente em trabalho realizado por Dettner & Schwinger (1982). Além dos compostos que já haviam sido identificados em *Bledius spectabilis* por Wheeler *et al.* (1972), os autores também identificaram uma série de compostos defensivos diferentes dos encontrados no trabalho anterior (Lista III, Apêndice). Os compostos defensivos que foram identificados pela primeira vez dentro de subfamília Oxytelinae são: decan-4-olida, undecan-4-olida, tetradecan-4-olida e dodecan-5-olida.

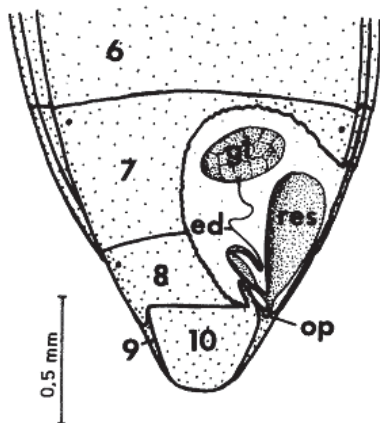


Figura 4. Desenho esquemático em vista dorsal do final do abdome Oxytelinae (Coleoptera:Staphylinidae), mostrando o complexo glandular. gl, glândula; ed, ducto eferente; op, abertura; res, reservatório. Fonte: Dettner & Schwinger (1982).

O complexo glandular abdominal de Oxytelinae está provavelmente relacionado com comportamentos defensivos, uma vez que os insetos pertencentes a esta subfamília dobram seu abdome e liberam as secreções oriundas do complexo glandular sempre que perturbados. Com base nas espécies que tiveram seu complexo glandular investigado fica evidente que esse aparato glandular dentro de Oxytelinae pode ser caracterizado quimicamente por: lactonas, alcanos, p-toluquinonas e p-toluhidroquinonas (Dettner & Schwinger, 1982).

Dentro da subfamília Oxytelinae muitas espécies consideradas derivadas filogeneticamente tiveram seus complexos glandulares investigados (ex: espécies do gênero *Bledius*) (Wheeler *et al.*, 1972; Dettner & Schwinger, 1982). A espécie *Coprophilus striatulus* Fabricius considerada como primitiva dentro da subfamília teve seu complexo glandular estudado por Dettner (1982). Diferentemente de outras espécies já investigadas dentro da subfamília, *Coprophilus striatulus* apresenta um complexo glandular formado por duas glândulas, enquanto que nas espécies que haviam sido investigadas até aquele momento era relatada a presença de apenas uma glândula (Fig.5).

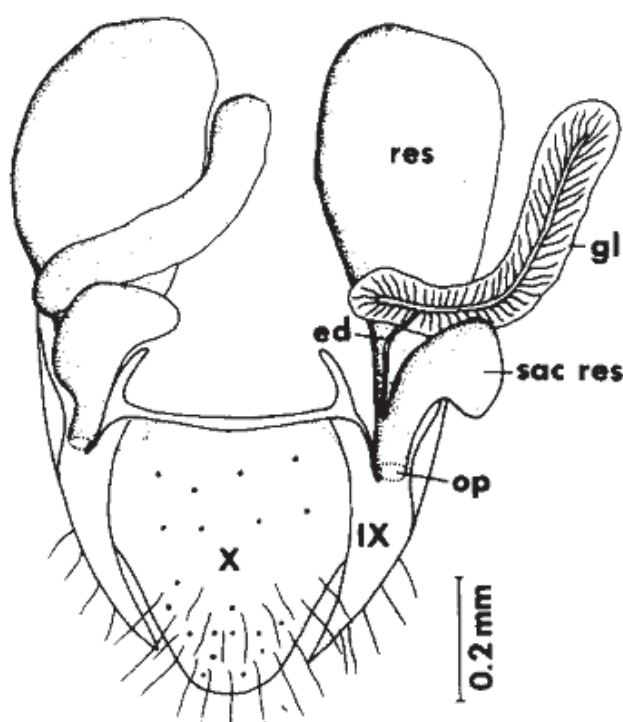


Figura 5. Desenho esquemático do complexo glandular de *Coprophilus striatulus* mostrando as duas glândulas distintas em vista dorsal. gl: tubo glandular; ed: ducto eferente; res: reservatório; sac: saco; op: abertura; IX e X : tergitos. Fonte: Dettner (1982).

Com base em análises de CG/EM foram identificados 21 compostos distintos para *Coprophilus striatulus* (Lista III, Apêndice), pertencentes às seguintes classes: p-toluquinona, p-toluhidroquinona e ésteres saturados de isopropila. O complexo glandular de *C. striatulus* apresenta diferenças tanto morfológicas quanto de composição química com relação a espécies mais derivadas dentro da subfamília como as dos gêneros *Bledius*, *Oxytelus* e *Plastystethus* (Dettner & Schwinger, 1982; Dettner, 1984). Apesar de ser uma espécie considerada primitiva dentro da subfamília, *Coprophilus striatulus* é a única a apresentar a capacidade de sequestrar ésteres saturados ou insaturados de isopropila. Essas substâncias são utilizadas pelas indústrias

de cosméticos como importantes agentes umidificantes, pois proporcionam uma melhor absorção dos produtos através da pele (Dettner & Schwinger, 1982). A espécie *C. striatulus* tem como principais inimigos naturais outros artrópodes e substâncias como ésteres atuam auxiliando a penetração de substâncias tóxicas como as p-toluquinonas através da cutícula de outros artrópodes durante a defesa (Dettner, 1984).

A espécie *Deleaster dichrous* Gravenhorst é considerada como pertencente ao gênero mais primitivo dentro da subfamília Oxytelinae, essa espécie foi escolhida por Dettner *et al.* (1985) para a realização de estudos comparativos com espécies consideradas filogeneticamente mais derivadas dentro da subfamília. Essa espécie apresenta um complexo glandular exclusivo com quatro glândulas presentes (sendo uma ou duas na maioria das espécies da subfamília). O complexo glandular I ou glândula vermelha (devido a sua coloração característica) faz parte do padrão de Oxytelinae. O complexo glandular II ou branco é exclusivo da espécie *Deleaster dichrous* (Dettner *et al.*, 1985).

Para o complexo glandular I foram identificados 17 compostos com função defensiva (Lista III, Apêndice), sendo o principal composto defensivo a p-toluquinona, esse composto foi encontrado em todas as espécies de Oxytelinae que tiveram seu complexo glandular investigado (Wheeler *et al.*, 1972; Dettner & Schwinger, 1982; Dettner, 1984; Dettner *et al.*, 1985).

O complexo glandular II de *D. dichrous* é preenchido com um líquido viscoso de coloração branca que endurece rapidamente ao ser exposto ao ar. Com base em observações feitas em laboratório, os autores sugerem que os compostos desse complexo glandular têm propriedades adesivas, uma vez que ao serem liberados, são capazes de paralisar outros indivíduos, como larvas de moscas e formigas (Dettner *et al.*, 1985).

Todas as espécies de Oxytelinae que tiveram seus complexos glandulares investigados possuem dois compostos tóxicos comuns, p-toluquinona e p-toluhidroquinona, os quais são misturados com uma gama de diferentes solventes (Dettner, 1993; Steidle & Dettner, 1995). As espécies *Bledius spectabilis* e *Bledius mandibularis* tiveram seus complexos glandulares investigados e demonstraram a presença de compostos comumente encontrados em outras espécies de Oxytelinae, como: p-toluquinona, alcenos, lactonas e citral, o que levava a crer que existia um padrão uniforme dentro do gênero (Wheeler *et al.*, 1972; Dettner & Schwinger, 1982; Steidle & Dettner, 1995). Com base nessa premissa, Steidle & Dettner (1995) investigaram quimicamente seis espécies de *Bledius*: *B. furcatus* Olivier, *B. tricornisi* Herbst, *B. dissimilis* Erichson, *B. opacus* Block, *B. subterraneus* Erichson e *B. arenarius* Paykull. Com base nesse estudo, os autores concluíram que mesmo entre espécies pertencentes ao mesmo gênero ocorre

variação dos compostos liberados (Huth & Dettner, 1990; Dettner & Reissenweber, 1991; Steidle & Dettner, 1993).

3.4 PAEDERINAE FLEMING

Essa subfamília é conhecida principalmente pelas espécies do gênero *Paederus* Fabricius que causam lesões de importância médica em seres humanos. Esses indivíduos apresentam substâncias tóxicas em sua hemolinfa que podem causar dermatites e conjuntivites consideradas de leves à graves (Vieira *et al.*, 2014) (Lista IV, Apêndice). Vorderman (1901) foi o primeiro a descrever as lesões causadas por indivíduos de *Paederus*, descrevendo essas lesões como sendo similares àquelas causadas pelo composto *Cataridine* conhecido para espécie *Lytta vesicatoria* Linnaeus da família de besouro Meloidae (Kellner & Dettner, 1995). As espécies do gênero *Paederus* apresentam uma coloração aposeimática, evidenciado sua hemolinfa tóxica, além disso, apresentam um complexo glandular localizado no quarto esterno abdominal, mas até o momento não se sabe se esse complexo é capaz de liberar secreções oriundas da hemolinfa tóxica dessas espécies (Kellner & Dettner, 1992).

Pederin é uma amida vesicante (que causa bolhas) e é o principal composto tóxico da hemolinfa das espécies de *Paederus*. Esse composto foi isolado primeiramente por Pavan & Bo em 1952 para a espécie *Paederus fuscipes* Curtis. Esse composto foi estruturalmente estudado e demonstrado possuir a fórmula molecular $C_{25}H_{45}NO_9$ (Cardani *et al.*, 1965). No mesmo trabalho os autores conseguiram isolar e identificar o composto *Pseudoperin*, como composto secundário da hemolinfa tóxica de *Paederus fuscipes*. Após um novo estudo com os extratos oriundos da hemolinfa de *Paederus fuscipes*, Cardani *et al.* (1967) isolaram e identificaram um terceiro composto tóxico para essa espécie a *Pederona*.

Matsumoto *et al.* (1968) revisaram a estrutura molecular proposta por Cardani *et al.* (1965). Com base nesse estudo os autores demonstraram que havia uma pequena diferença na estrutura do composto com relação ao proposto por Cardani *et al.* (1965) a diferença é a posição de uma hidroxila (OH), que na fórmula anterior era relatada para o carbono 3 mas se encontra no carbono 4.

O composto *Pederin* é extremamente tóxico a várias células eucarióticas, tendo como característica o bloqueio da síntese de proteína. Em bioensaios de toxicidade foi demonstrado que se uma pequena quantidade desse composto for injetada intraperitonealmente (0,14 mg/kg) pode levar a morte mamíferos de pequeno porte como camundongos. Devido a essa

característica citotóxica, *Pederin* é considerado um composto defensivo (Pavan & Dazzini, 1971; Pavan, 1975; Blum, 1981). Adultos da espécie *Paederus fuscipes* são conhecidos por possuírem cerca de 1 µg de *Pederin* nos machos e essa quantidade pode ser até dez vezes maior nas fêmeas, até mesmo ovos, larvas e pupas são conhecidos por possuírem quantidades desse composto (Pavan, 1975; Kellner & Dettner, 1995).

Trabalhando também com a espécie *Paederus fuscipes* Kellner & Dettner (1995) quantificaram o composto *Pederin* para machos e fêmeas e demonstraram que, em média, os machos têm uma concentração do composto de 1,3 µg enquanto que as fêmeas possuem 18,6 µg. Os autores demonstraram ainda que na maioria das fêmeas da espécie *Paederus riparius* ocorre a transferência do composto tóxico *Pederin* para os ovos.

3.5 PROTEININAE ERICHSON

Essa é uma pequena subfamília de Staphylinidae tanto em seu tamanho corporal (em geral com cerca de 3 mm de comprimento) quanto na quantidade de espécies identificadas (193), alocadas em onze gêneros. Podem ser encontradas em folhas caídas, fungos em decomposição e em animais em decomposição (Herman, 2001; Navarrete-Heredia *et al.*, 2002).

Como nas espécies de Omaliinae, os indivíduos pertencentes a essa subfamília liberam secreções defensivas através de glândulas presentes entre o sexto e o sétimo esternito abdominal (Klinger & Maschwitz, 1977). Estão identificados compostos defensivos para cinco espécies dessa subfamília (Lista V, Apêndice), estes compostos, na sua maioria, pertencem às seguintes classes químicas: aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, compostos aromáticos, hidrocarbonetos e terpenos, assim como em Omaliinae (Dettner & Reissenweber, 1991).

Os complexos glandulares das espécies de Proteininae e Omaliinae são morfologicamente idênticos e liberam um mesmo padrão de compostos químicos defensivos, baseando-se nas espécies que tiveram seus complexos glandulares previamente estudados. Entretanto, de acordo com a hipótese de relacionamento apresentada por Thayer (2005), utilizando observações morfológicas, Omaliinae é mais relacionada filogeneticamente à subfamília Microsilphinae. Contudo, novos estudos de filogenia são necessários para uma melhor compreensão das relações entre essas duas subfamílias.

3.6 PSELAPHINAE LATREILLE

É uma subfamília de minúsculas espécies predadoras no folhíço (em geral medem 1-3 mm de comprimento) muito diversa e globalmente distribuída, atualmente esse é o segundo agrupamento de espécies com maior diversidade dentro da família Staphylinidae (9854 espécies descritas). Essa subfamília é principalmente diversa em florestas tropicais (Schomann *et al.*, 2008; Parker, 2016). São facilmente diferenciados de outros estafilinídeos devido a sua morfologia característica, em geral, os indivíduos apresentam os corpos compactos, pequenos e a cabeça e o pronoto são mais estreitos do que os élitros (Navarrete-Heredia *et al.*, 2002). Apesar de possuir uma enorme diversidade de espécies, pouco se sabe sobre a ecologia química dentro de Pselaphinae, talvez devido ao fato de as espécies dessa subfamília apresentarem um tamanho corporal muito pequeno, o que dificulta a coleta e identificação correta dos exemplares.

O que há, de fato, são trabalhos com compostos oriundos de outros grupos de seres vivos, como o de Faldt *et al.* (1999) que coletaram exemplares do gênero *Euplectus* usando armadilhas com o composto 1-octen-3-ol oriundo de fungos *Fomitopsis pinicola* Karst e *Fomes fomentarius* L. Exemplares de *Trimium brevicorne* Reichenbach foram coletados em armadilhas usando o composto feromonil (2*R*)-6-metil-5-hepten-2-ol das espécies de besouros *Gnathotrichus retusus* LeConte e *Gnathotrichus sulcatus* LeConte (Curculionidae: Scolytinae) Martikainen *et al.*, 2001).

3.7 STAPHYLININAE LATREILLE

É a terceira maior subfamília em número de espécies dentro de Staphylinidae, com mais de sete mil espécies descritas para o mundo todo (Navarrete-Heredia *et al.*, 2002). As espécies dessa subfamília liberam compostos defensivos através de um complexo glandular localizado no ápice do abdome, formado por um par de glândulas pareadas, chamadas de glândulas pigidiais (Figura.6) (Bellas *et al.*, 1974; Dettner, 1983) (Lista VI, Apêndice).

Investigações da ecologia química dessa enorme subfamília começam no trabalho de Abou-Donia *et al.* (1971), com a espécie *Staphylinus olens* (Müller). Analisando extratos de “glândulas de cheiro” (o autor não especifica a localização dessas glândulas, provavelmente se referindo às glândulas pigidiais presentes no fim do abdome), os autores identificaram como composto majoritário o iridodial (2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído). Esse composto já havia sido identificado em espécies de formigas sempre associado com o composto 6-metilhept-5-en-2-ona, sendo o iridodial relatado como um composto de fixação. Para

Staphylinus olens o composto iridodial não está acompanhado de 6-metilhept-5-en-2-ona, provavelmente exercendo outra função, possivelmente de defesa (Abou-Donia, 1971).

Thyrecephalus Zquini (Fauvel), *Eulissus orthodoxus* (Olliff), *Creophilus erythrocephalus* (F.), *Hesperus semirufus* Fauvel, e *Philonthus politus* (L.) tiveram os extratos de suas glândulas pigidiaias investigados quimicamente através de CG/EM por Bellas *et al.* (1974). Os autores identificaram quatro compostos defensivos para essas espécies: isovaleraldeído (3-metilbutanal), citrônella (3,7-dimetil-6-octenal), actinidina ((*E*)-3,7-dimetil-2,6-octadienal) e iridodial (2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído) que já havia sido identificado e sugerido como composto defensivo para *Staphylinus olens* (Abou-Donia *et al.*, 1971).

Staphylinus olens teve suas glândulas pigidiaias investigadas novamente, dessa vez por Fish & Pattenden (1975), que encontraram um novo composto defensivo além do iridodial já encontrado no trabalho de Abou-Donia *et al.* (1971). O novo composto 4-metilhexan-3-ona foi identificado através da técnica de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas.

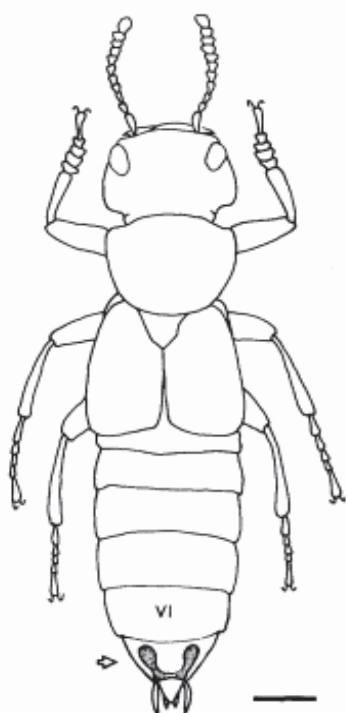


Figura 6. Desenho esquemático mostrando a posição das glândulas pigidiaias em Staphylininae, com base na espécie *Creophilus maxillosus* Linnaeus. Fonte: Jefson *et al.* (1982).

Como já demonstrado nos tópicos anteriores desta revisão, dentro de Staphylinidae existe uma grande variação nos tipos de compostos químicos liberados. Essa variação usualmente acontece entre as subfamílias, gêneros ou entre espécies diferentes. Entretanto,

trabalhando com glândulas pigidiaias das espécies *Cafius quadriimpressus* (White), *Philonthus politus* (Linnaeus), *Thyreocephalus orthodoxus* (Olliff) e *Thyreocephalus chloropterus* (Erichson) coletadas na Nova Zelândia, Gnanasunderam *et al.* (1981) encontraram algumas variações nos composto defensivos dentro dessas espécies e *Thyreocephalus orthodoxus* e indivíduos da mesma espécie coletada na Austrália e analisada por Bellas *et al.* (1974). Foram identificados vários compostos defensivos para essas espécies, principalmente alcanos e hidrocarbonetos.

Thyreocephalus orthodoxus e *Thyreocephalus chloropterus* apresentam como compostos majoritários o citronelal (3,7-dimetil-6-octenal), iridodial (2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído) e citral ((*Z,E*)-3,7-dimetil-2,6-octadienal). Curiosamente, exemplares de *Thyreocephalus orthodoxus* coletados na Austrália e na Nova Zelândia apresentaram diferença entre os compostos majoritários. Enquanto que os exemplares da Nova Zelândia apresentaram como compostos majoritários o citronelal e iridodial, os exemplares australianos apresentaram um terceiro composto que não foi identificado nas espécies neozelandesas, o 3-metilbutanal. Variações químicas intraespecíficas podem estar relacionadas com vários fatores relacionados ao ambiente em que os indivíduos vivem, como exposição a diferentes pressões de predadores, *stress* devido a desenvolvimento de doenças e diferentes dietas (Duffey, 1976; Gnanasunderam, 1981).

Cafius quadriimpressus os compostos majoritários identificados foram *actinidine* (6,7-dihidro-4,7-dimetil-5H-2-pirindina) e pentadecano. *Philonthus politus* apresentou os dois mesmos compostos majoritários identificados para *Carfius quadriimpressus* além de um terceiro identificado com tridecano.

Creophilus maxillosus teve suas glândulas pigidiaias investigadas quimicamente por Jefson *et al.* (1982) pela técnica de CG/EM e foram identificados 11 compostos considerados defensivos presentes nessas glândulas. Os autores demonstraram que o composto dihidronapetalactona presente nas glândulas pigidiaias de *Creophilus maxillosus* é eficiente contra os ataques de formigas em bioensaios realizados com a espécie de formiga *Formica exsectoides* Forel.

Treze espécies da subtribo Staphylinina tiveram seus complexos glandulares investigados quimicamente por Huth & Dettner (1990). Utilizando a técnica de CG/EM, os autores identificaram 41 compostos defensivos diferentes para essas treze espécies (Lista VI, Apêndice).

Algumas espécies dentro de Staphylininae foram coletadas com compostos voláteis oriundos de outro grupo de seres vivos. Trabalhando com extratos de fungos Faldt *et al.* (1999) coletaram a espécie *Philonthus succicola* Thomson com o composto 1-octen-3-ol. Com base no composto feromonal (2R)-6-metil-5-hepten-2-ol oriundo de espécies do gênero *Gnathotrichus* (Coleoptera: Scolytidae), Martikainen *et al.* (2001) coletaram *Nudobius lentus* Gravenhors, *Quedius tenellus* Gravenhorst e *Quedius xanthopus* Erichson. Pekár (2002) trabalhando com armadilhas de interceptação de queda (Pitfall) utilizando como isca atrativa o composto formaldeído, coletou indivíduos pertencentes ao gênero *Philonthus*.

3.8 STENINAE MACLEAY

É uma subfamília composta por apenas dois gêneros *Stenus* Latreille (considerado o maior gênero do reino animal com cerca de 2600 espécies descritas) e *Dianous* Leach (Lang *et al.*, 2015). Geralmente as espécies pertencentes a essa subfamília vivem em bordas de rios e riachos, deslocando-se tanto na água quanto em terra firme. Desde o começo do século passado, um comportamento bastante curioso tem sido relatado para as espécies de Steninae. Quando os indivíduos se encontram na água e são perseguidos por algum predador eles são capazes de se deslocar rapidamente pela água até a terra, esse comportamento ficou conhecido como *Skimming* (Piffard, 1901; Billard & Bruyant, 1905; Lang *et al.*, 2012).

Investigando esse comportamento de *Stenus bipunctatus* Erichson, Schildknecht (1970) demonstrou que essa estratégia estava ligada às glândulas pigidiaias (localizadas no ápice do abdome) dos indivíduos. Quando ameaçada por algum predador na água, essa espécie libera secreções de suas glândulas pigidiaias que formam uma espécie de jato propulsor, fazendo com que os indivíduos consigam se deslocar rapidamente pela água até a costa e assim fugir dos predadores (Fig. 7) (Schildknecht, 1970).

Os compostos químicos responsáveis por essa incrível estratégia de fuga são terpenos de superfície ativa, identificados por cromatografia gasosa, como sendo 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2.]octano, 6-isopropenil-2-metil-1-ciclohexenol e 6-metil-5-hepten-2-ona (Schildknecht, 1970).

Trabalhando com a glândula pigidial de *Stenus comma* Leconte, que exibe o mesmo comportamento de fuga que *Stenus bipunctatus*, Schildknecht *et al.* (1976) através da técnica de CG/EM identificaram três compostos majoritários: 1,8 ceneole, 6-metilhept-5-en-2-ona e *stenusin* (N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina). Segundo os autores, esses compostos têm como

função principal romper a tensão superficial da água (o que ajuda no deslocamento rápido em caso de fuga). Essa hipótese foi testada e demonstrada através de testes com um tensiômetro e demonstraram que os três compostos majoritários têm uma tensão superficial baixa, sendo considerados agentes de dispersão. Além disso, *Stenusine* é um composto também utilizado na defesa devido a sua toxicidade e 1,8-cineole é conhecido por suas propriedades antisépticas (Schildknecht, 1976).

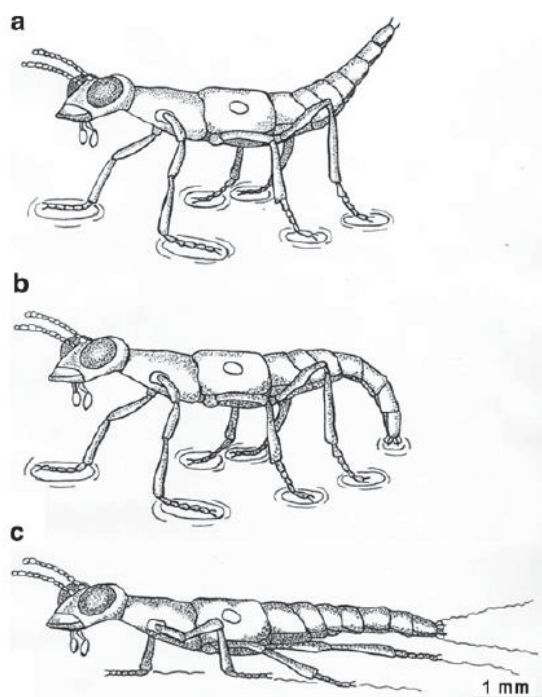


Figura 7. Desenho esquemático do comportamento de fuga em *Stenus comma* Leconte utilizando suas glândulas pigidiais. **A**, Espécime de *Stenus* sobre a superfície da água, devido aos seus tarsos hidrofóbicos. **B**, O indivíduo dobra seu abdômen e emite uma pequena quantidade de secreção na água. **C**, Espécime de *Stenus* sendo impulsionado para frente pela liberação das secreções. Fonte: Lang *et al.* (2012).

O composto químico *stenusin* também foi identificado com principal composto do complexo glandular pigidial para as espécies *Stenus junco* Paykull, *Stenus clavicornis* Scopoli, *Stenus providus* Erichson, *Stenus bimaculatus* Gyllenhal e *Stenus fulvicornis* Stephens (Lusebrink *et al.*, 2007). No ano seguinte, trabalhando com outras espécies de *Stenus*, Lusebrink *et al.*, (2009) (Lista VII, Apêndice) verificaram que em *S. solutus* Erichson e *S. cicindeloides* Schaller não havia o composto *Stenusin*, mas sim alcalóides como compostos defensivos majoritários. Os compostos identificados para essas espécies foram: (*E*)-3-(2-metil-1-butenil)-piridina, 3-(1-isobutenil)-piridina e um terceiro composto que não foi identificado. Já em 2012

através de técnicas de CG/EM e RMN (Ressonância Magnética Nuclear), Müller *et al.* (2012) conseguiram realizar a identificação do composto desconhecido do trabalho anterior, como sendo o alcalóide *cicindeloina* (2S,3S,1S)-2-sec-butil-1-oxa-5-azaspiro[2.5]oct-4-eno).

Em geral, glândulas pigidiais de Staphylinidae liberam compostos defensivos (como em Oxytelinae e Proteiinae). Apesar disso, nas espécies de *Stenus* esses compostos liberados por glândulas pigidiais apresentam mais de uma função, com isso, o complexo glandular de *Stenus* é considerado multifuncional (Schierling *et al.*, 2013). Como já mencionado anteriormente, compostos como *Stenusina* são utilizados no comportamento de fuga na água, denominado de *Skimming*. Entretanto, quando molestadas, as espécies de *Stenus* exibem comportamento típico de estafilínidos, esses indivíduos dobram a parte basal do seu abdome e liberam secreções defensivas em direção ao agressor (Betz, 1999).

Após a realização de bioensaios com formigas Schierling *et al.* (2013) demonstraram que os compostos liberados por espécies de *Stenus* como: *stenusina*, *norstenusina* (2-metil-1-butenil) piridina e *Cicindeloina* apresentam uma forte ação repelente. Espécies de formigas, ao entrarem em contato com esses compostos, rapidamente se afastam e exibem um comportamento de limpeza de suas antenas. O mesmo trabalho testou e demonstrou que os compostos *stenusina*, *norstenusina* e *cicindeloina* apresentam uma alta ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

As espécies de Steninae da Europa Central podem ser agrupadas em três principais grupos de espécies baseando-se no tipo de secreção defensiva que liberam (Schierling *et al.*, 2013). Utilizando filogenia molecular, Lang *et al.* (2015) testaram a hipótese de Schierling e apresentaram uma hipótese evolutiva dos compostos presentes nas espécies de Steninae da Europa Central, na qual foram encontrados os mesmo três clados hipotetizados por Schierling *et al.* (2013) (Fig. 8).

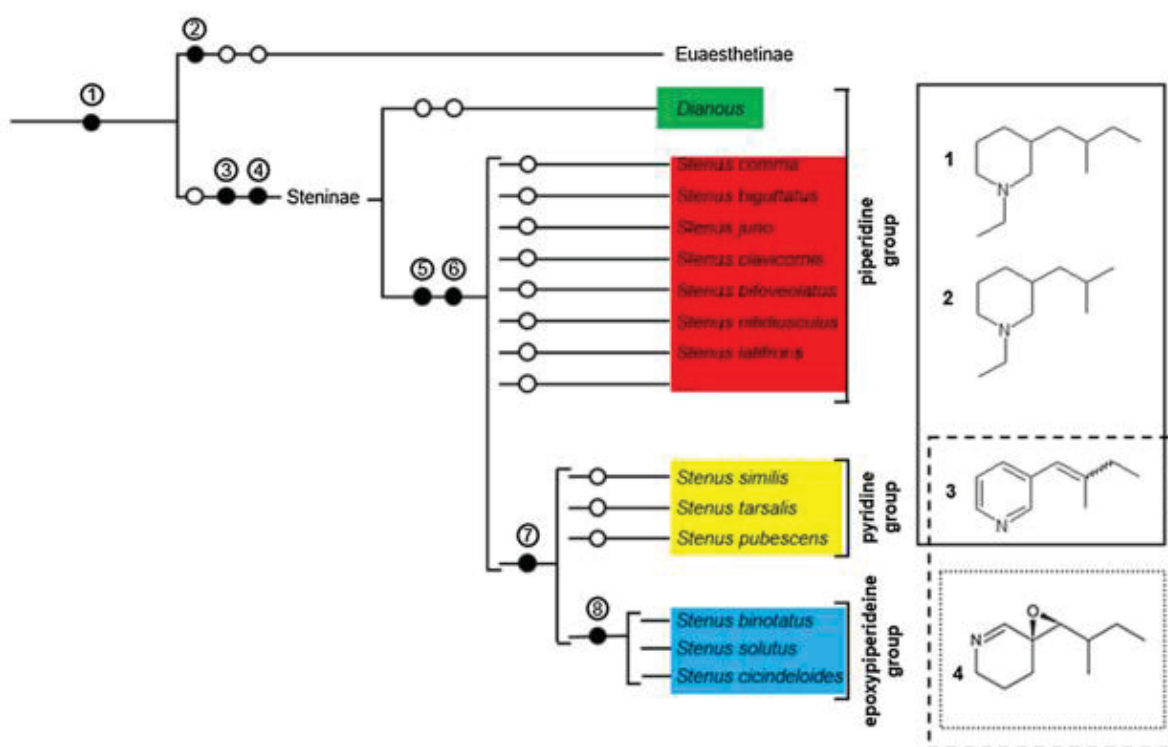


Figura 8. Hipótese filogenética da evolução dos compostos químicos de glândulas pigidiais em *Stenus*. Fonte: Lang *et al.* (2015).

3.9 TACHYPORINAE MACLEAY

É uma pequena subfamília de Staphylinidae (1513 espécies descritas) de indivíduos de corpo limulóide que são, na sua maioria, saprófagos (Navarrete-Heredia *et al.*, 2002). Estudos de ecologia química para espécies dessa subfamília são inexistentes até o momento. O que existe são trabalhos utilizando compostos de outros organismos que foram capazes de coletar algumas espécies de Tachyporinae, o que pode sugerir uma atração das espécies de Tachyporinae a esses compostos.

Faldt *et al.* (1999) coletaram alguns exemplares de *Lordithon lunulatus* L. usando os compostos 1-octen-3-ol e octan-3-ona oriundos dos fungos *Fomitopsis pinicola* e *Fomes fomentarius*, sendo esses compostos considerados atrativos a várias espécies de besouros. Pekár (2002) trabalhando com armadilhas de interceptação de queda do tipo Pittfall iscadas com o composto químico formaldeído coletou exemplares de Tachyporinae pertencentes ao gênero *Tachyporus*.

4. CONCLUSÃO

A ecologia química objetiva compreender a origem, função e significância de compostos naturais que medeiam interações entre os organismos. Apesar disso, muitos trabalhos abordando Staphylinidae apenas identificaram os compostos químicos presentes nos indivíduos e não contemplam bioensaios, o que proporcionaria um melhor entendimento acerca das funções biológicas dos compostos, ou ainda, a utilização da técnica de eletroantenografia, que permitiria averiguar a percepção das espécies a um determinado composto. Por exemplo, as glândulas terçais em Aleocharinae são conhecidas por apresentarem função defensiva devido à grande quantidade de quinonas presentes nas suas secreções, apesar disso, essas glândulas apresentam uma grande quantidade de outros compostos como aldeídos e hidrocarbonetos de função quase que desconhecida. Como demonstrado por Pesch (1986 e 1987) através de bioensaios, os compostos (Z)-tridec-4-eno, dodecanal e (Z)-tetradec-5-eno presentes na glândula tergal de *Aleochara curtulas* são responsáveis por atração a curta distância para a cópula.

Apesar de ser um grupo de espécies extremamente diverso, apenas uma espécie de Staphylinidae teve compostos feromonais identificados (*Aleochara curtula* Goeze). Em sua totalidade os estudos abordando essa família tratam apenas de compostos de origem defensiva.

Dentro das diversas subfamílias de Staphylinidae, as glândulas abdominais defensivas evoluíram de forma independente e variam não apenas na posição, mas também no tipo de substância defensiva secretada. Esses compostos variam entre quinonas (Aleocharinae e Oxytelinae), iridoides (Staphylininae), ácidos e alcanos (Omaliinae, Proteininae) ou compostos altamente especializados como *penderin* (Paederinae) ou *stenusin* (Stenusinae).

A maioria dos estudos de ecologia química com feromônio de insetos foram realizados o com espécies consideradas pragas de plantações ou de produtos estocados, esses estudos são de natureza aplicada e visam o monitoramento e controle desses insetos. Entretanto, estudos de ecologia química com insetos não considerados pragas também são importantes, fornecem uma visão mais geral dos processos químicos e bioquímicos envolvidos na produção de vários compostos, além de fornecer novas estruturas químicas (Hayes *et al.*, 2003). Além disso, estudos de ecologia química em grandes grupos de espécies podem gerar caracteres importantes, que podem ser utilizados tanto na separação de espécies crípticas (Braga *et al.*, 2013; Chien & Lin, 2015), como em estudos filogenéticos (Steidle & Dettner, 1993; Hayes *et al.*, 2003; Caetano & Machado, 2013).

REFERÊNCIAS

- Abou-Donia, S. A., Fish, L.J. & Pattenden, G. (1971). Iridodial from the odoriferous glands of *Staphylinus olens* (Coleoptera: Staphylinidae). **Tetrahedron Letters**, 43, 4037- 4038.
- Akino, T. & Yamaoka, R. (2000). Evidence for volatile and contact signals of nestmate recognition in the black shining ant *Lasius fuliginosus* Latreille (Hymenoptera: Formicidae). **Entomological Science**, 3, 1–8.
- Akino, T. (2002). Chemical camouflage by myrmecophilous beetles *Zyras comes* (Coleoptera: Staphylinidae) and *Diaritiger fossulatus* (Coleoptera: Pselaphidae) to be integrated into the nest of *Lasius fuliginosus* (Hymenoptera: Formicidae). **Chemoecology**, 12, 83-89.
- Araujo, J. (1978). Anatomie compare des systems glandulaires de defense chimiqui des Staphylinides (Coleoptera). **Archives de Biologie**, 89, 217-250.
- Ashe, J.S. (2002). Aleocharinae *In*: Navarrete-Heredia, J.L., Newton, A.F. & Thayer, M.K. Guía ilustrada para los generos de Staphylinidae (Coleoptera) de México. Universidad de Guadalajara, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Mexico, 121–199.
- Bellas, T. E., Brown, W. V. & Moore, B. P. (1974). The alkaloid actinidine and plausible precursors in defensive secretions of rove beetles. **Journal of Insect Physiology**, 20, 277-280.
- Betz, O. (1999). A behavioral inventory of adult *Stenus* species (Coleoptera: Staphylinidae). **Journal of Natural History**, 33, 1691–1712.
- Billard, G. & Bruyant, C. (1905). Sur une mode particulier de locomotion de certains *Stenus*. **Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologi**, 59, 102–103.
- Blum M. S., Crewer. M. & Pasteels J. M. (1971). Defensive secretion of *Lomechus strumosa*, a myrmecophilous beetle. **Annals of entomological Society of America**, 64, 975-976.
- Blum, M.S. (1981). Chemical Defenses of Arthropods, **Academic Press**, New York.
- Bouchard, P. *et al.* (2011). Family -group names in Coleoptera (Insecta). **Zookeys**, 88, 1–972.
- Braga, M. V., Pinto, Z. T., Queiroz, M. M. C., Matsumoto, N. & Bomquist, G. J. (2013). Cuticular hydrocarbons as a tool for the identification of insect species: Puparial cases from Sarcophagidae. **Acta Tropica**, 128, 1-13.
- Brand, J. M., Blum, M. S., Fales, H. M. & Pasteels, J.M. (1973). The chemistry of the defensive secretion of the beetle *Drusilla canaliculata*. **Journal of Insect Phyfiology**, 19, 369-382.

- Caetano, D. S. & Machado, G. (2013). The ecological tale of Gonyleptidae (Arachnida, Opiliones) evolution: phylogeny of a Neotropical lineage of armoured harvestmen using ecological, behavioural and chemical characters. **Cladistics**, 29, 589-609.
- Cardani C., Ghiringhelli, D., Mondelli, R. & Quilico, A. (1965). The structure of pederin. **Tetrahedron Letter**, 29, 2537-2545.
- Cardani C., Ghiringhelli, D., Mondelli, R. & Quilico, A. (1967). The structure of pederone, a novel substance from *Paederus* (Coleoptera: Staphylinidae). **Tetrahedron Letter**, 41, 4023-4025.
- Chien, C. H. & Lin, C. C. (2015). Chemotaxonomic Analysis of the Venom Composition within the Ant Genus *Strumigenys* (Hymenoptera: Formicidae) in Taiwan. **Sociobiology**, 62, 374-381.
- Dettner, K. & Schwlnger, G. (1982). Defensive secretions of three Oxytelinae rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae). **Journal of Chemical Ecology**, 8, 1411-1420.
- Dettner, K. (1983). Vergleichende Untersuchungen zur Wehrchemie und Drüsenmorphologie von Kurzfluglem aus dem Subtribus Philonthina (Coleoptera, Staphylinidae). **Zeitschrift für Naturforschung**, 38, 319-328.
- Dettner, K. (1984). Isopropylesters as wetting agents from the defensive secretion of the rove beetle *Coprophilus striatulus* F. (Coleoptera, Staphylinidae). **Insect Biochemical**, 14, 383-390.
- Dettner K., Schwinger, G. & Wunderle, P. (1985). Sticky secretion from two pairs of defensive glands of rove beetle *Deleaster dichrous* (Grav.) (Coleoptera: Staphylinidae). **Journal of Chemical Ecology**, 11, 859-883.
- Dettner, K. & Reissenweber, F. (1991). The Defensive Secretion of Omaliinae and Proteininae (Coleoptera: Staphylinidae): Its Chemistry, Biological and Taxonomic Significance. **Biochemical Systematics and Ecologyn**, 19, 291-303.
- Dettner, K. (1993). Defensive secretions and exocrine glands in free-living staphylinid beetles. Their bearing on phylogeny (Coleoptera: Staphylinidae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 19, 291-303.
- Dettner, K. & Liepert, C. (1994). Chemical Mimicry And Camouflage. **Annual Review of Entomology**, 39, 129-154.
- Duffey, S. S. (1976). Arthropod allomones: chemical effrontories and antagonists. **Proc. XV Int. Congr. Ent. Washington**.

- El-Sayed A. M. (2014). The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. Disponível em: <<http://www.pherobase.com>>.
- Fäldt, J., Jonsell, M., Nordlander, G. & Borg-Karlson, A. K. (1999). Volatiles of bracket fungi *Fomitopsis pinicola* and *Fomes fomentarius* and their functions as insect attractants. **Journal of Chemical Ecology**, 25, 567-590.
- Fish, L. J. & Pattenden, G. (1975). Iridodial and a new alkanone, 4-methyl-hexan-3-one, in the defensive secretion of the beetle *Staphylinus olens*. **Journal of Insect Physiology**, 21, 741-744.
- Grebennikov, V. V. & Newton, A. (2009). Good-bye Scydmaenidae, or why the ant-like stone beetles should become megadiverse Staphylinidae sensu latissimo (Coleoptera). **European Journal of Entomology**, 106, 275–301.
- Gnanasunderam, C., Butcher, C. F. & Hutchins, R. F. N. (1981). Chemistry of the defensive secretions of some New Zealand rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae). **Insect Biochemical**, 11, 411-416.
- Gnanasunderam, C., Butcher, C. F., Hutchins, R. F. N. & Young, H. (1981). Ethyl decanoate as a major component in the defensive secretion of two New Zealand Aleocharine (Staphylinidae) beetles-*Tramiathaea cornigera* (Broun) and *Thamiaraea fuscicornis* (Broun). **Journal of Chemical Ecology**, 7, 197-202.
- Happ, G. M. & Happ, C. M. (1973). Fine structure of the pygidial glands of *Bledius mandibularis* (Coleoptera, Staphylinidae). **Tissue Cell**, 5, 215-231.
- Hayes, P. Y., Fletcher, M. T., Chow, S., McGrath, M. J., Tu, Y. Q., Zhang, H., Hungerford, N. L., McErlean, C. S. P., Stok, J. E., Moore, C. J., DeVoss, J. J. & Kitching, W. (2003). Insect chemistry and chirality. **Chirality**, 15, 116–127.
- Heman, L. H. (1970). Phylogeny and reclassification of the genera of the rove beetle subfamily Oxytelinae of the world (Coleoptera, Staphylinidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 142, 343-454.
- Herman, L. H. (2001). Catalog of the Staphylinidae (Insecta: Coleoptera) 1758 to the end of the second millennium, parts I–VII. **Bulletin of the American Museum of Natural History** 167,1–4218. doi:10.1206/0003-0090(2001)264< 0003:NCITSI>2.0.CO.
- Hollard, V. D. & Delius, J. D. (1982). Chemical Mimicry in the Myrmecophilous Beetle *Myrmecaphodius excavaticollis*. **Science**, 218, (19):
- Holldobler, B. (1967). Zur Physiologie der Gast-Wirt-Beziehungen (Myrmekophilie) bei Ameisen. I. Das Gastverhältnis der Ateomes- und *Lomechusa*-Larven (Col.,

- Staphylinidae) zu Formica (Hym. Formicidae). **Zeitschrift für vergleichende Physiologie**, 56, 1-2.
- Howard, R. W., Akre, R. D. & Garnett, W. B. (1990). Chemical mimicry of an obligate predator of carpenter ants (Hymenoptera: Formicidae). **Annals of Entomological Society of America**, 83, 607-616.
- Huth, A. & Dettner, K. (1990). Defense chemicals from abdominal glands of 13 rove beetle species of the subtribe Staphylinina (Coleoptera: Staphylinidae: Staphylininae). **Journal of Chemical Ecology**, 16, 2691-2711.
- Jefson, M., Meinwald, J., Nowicki, S., Hicks, K. & Eisner, T. (1983). Chemical defense of a rove beetle (*Creophilus maxillosus*). **Journal of Chemical Ecology**, 9, 159-180.
- Jordan K. H. C. (1913). Zur Morphologie und Biologie der myrmecophilen Gattungen *Lomechusa* und *Atemeles* und einiger verwandter. **Formenwiss**, 107, 346-386.
- Karlson, P. & Luscher, M. (1959). Pheromones - New term for a class of biologically active substances. **Nature**, 183, 55-56.
- Kellner, R. L. L. & Dettner, K. (1992). Comparative morphology of abdominal glands in Paederinae (Coleoptera: Staphylinidae). **Journal of Insects Morphology**, 21, 117-135.
- Kellner, R. & Dettner, K. (1995). Allocation of pederin during lifetime of *paederus* rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae): evidence for polymorphism of hemolymph toxin. **Journal of Chemical Ecology**, 21, 1719-1733.
- Kistner, D. H., & Blum, M. S. 1971. Alarm pheromone of *Lasius (Dendrolasius) spathepus* (Hymenoptera: Formicidae) and its possible mimicry by two species of *Pella* (Coleoptera: Staphylinidae). **Annals of Entomological Society of America**, 64, 589-594.
- Kistner, D. H. (1979). Social and evolutionary significance of social insects symbionts. Social insects (ed. By H. R. Herman), Vol. I, pp. 339-413. **Academic Press**, New York.
- Klemm, K. & Boland, W. (2002). (*R*)-(+)-Palasonin, a Cantharidin-related plant toxin, also occurs in insect hemolymph and tissues. **Journal of Chemical Ecology**, 28, 1315-1327.
- Klinger, R. & Maschwitz, U. (1977). The defensive gland of omaliinae (Coleoptera: Staphylinidae). I Gross morphology of the gland and identification of the scent of *Eusphalerum longipenne* Erichson. **Journal of Chemical Ecology**, 3, 401-410.
- Lang, C., Seifert, K. & Dettner, K. (2012). Skimming behaviour and spreading potential of *Stenus* species and *Dianous coerulescens* (Coleoptera: Staphylinidae). **Naturwissenschaften**, 99, 937-947.

- Lang, C., Koerner, L., Betz, O., Puthz, V. & Dettner, K. (2015). Phylogenetic relationships and chemical evolution of the genera *Stenus* and *Dianous* (Coleoptera: Staphylinidae). **Chemoecology**, 25, 11–24.
- Lusebrink, I., Burkhardt, D., Gedig, T., Dettner, K., Mosandl, A. & Seifert, K. (2007). Intrageneric differences in the four stereoisomers of stenusine in the rove beetle genus, *Stenus* (Coleoptera, Staphylinidae). **Naturwissenschaften**, 94, 143-147.
- Martikainen, P., Viiri, H. & Raty, M. (2001). Beetles (Coleoptera) caught with pheromones of *Gnathotrichus retusus* and *G. sulcatus* (Col., Scolytidae) in southern Finland. **Anzeiger für Schädlingkunde**, 74, 7-10.
- Matsumoto, T., Yanagiya, M., Maeno, S. & Yasuda, S. (1968). A revised structure of pederin. **Tetrahedron Letter**, 60, 6297-6300.
- Moorhouse, J. E., Yeadon, R., Beevor, P. S. & Nesbitt, B. F. (1969). Method for use in studies of insect chemical communication. **Nature**, 223, 1174-1175.
- Navarrete-Heredia, J. L.; Newton, A. F.; Thayer, M. K.; Ashe, J.S. & Chandler, D.S. (2002). Guía ilustrada de los géneros de Staphylinidae (Coleoptera) de México - Illustrated Guide to the Genera of Staphylinidae (Coleoptera) of Mexico. **Universidad de Guadalajara y CONABIO, México**, D.F., pp. xii + 401.
- Newton, A. F. & Thayer, M. K. (1995). Protopselaphinae new subfamily for *Protopselaphus* new genus from Malaysia, with a phylogenetic analysis and review of the Omaliine Group of Staphylinidae including Pselaphidae (Coleoptera), pp. 219-320. In: J. Pakaluk & S. A. Slipinski (eds.). *Biology, phylogeny and classification of Coleoptera: Papers celebrating the 80th birthday of Roy A. Crowson*. **Muzeum in Instytut Zoologii PAN, Warszawa**. x+ 1092 pp. In e vols.
- Newton, A. F., Thayer, M. K., Ashe, J. S. & Chandler, D.S. (2000). Staphylinidae Latreille, 1802. *American Beetles, Volume 1: Archostemata, Myxophaga, Adephaga, Polyphaga: Staphyliniformia* (ed. by R.H. Arnett and M.C. Thomas), pp. 272–418. **CRC Press LLC, Boca Raton, FL**.
- Parker, J. (2016). Emergence of a superradiation: pselaphine rove beetles in mid-Cretaceous amber from Myanmar and their evolutionary implications. **Systematic Entomology**, 41, 541–566.
- Pasteels, J. (1968). Le système glandulaire et tégumentaire des Aleocharinae (Coleoptera, Staphylinidae) et son évolution chez les espèces termitophiles du genre *Termitella*. **Arch Biol**, 79, 381–446.

- Pavan, M. & Bo, G. (1953). Pederin. Toxic principle obtained in the crystalline state from the beetle *Paederus fuscipes* Curtis. **Physiology Comparison**, 3, 307-312.
- Pavan, M. & Dazzini, V. M. (1971). Toxicology and pharmacology Arthropoda—, pp. 365-409, in M. Florkin and B.T. Scheer (eds.). Chemical Zoology, Vol, IV. Arthropoda Part B. **Academic Press**. New York.
- Pavan, M. (1975). Sunto delle attuali eonoscenze sulla pederina. **Pubblicazioni dell'Istituto di Entomologia Agraria dell' Universith di Pavia**. pp. 1-35.
- Pekár, S. (2002). Differential effects of formaldehyde concentration and detergent on the catching efficiency of surface active arthropods by pitfall traps. **Pedobiologia**, 46, 539-547.
- Peschke, K. (1978). The female sex pheromone of the staphylinidae beetle, *Aleochara curtula*. **Journal of Insect Physiology**, 24, 197-200.
- Peschke, K. & Metzler, M. (1982). Defensive and pheromonal secretion of the tergal gland of *Aleochara curtula*. I. The chemical composition. **Journal of Chemical Ecology**, 8, 773-783.
- Peschke, K. (1983). Defensive and pheromonal secretion of the tergal gland of *Aleochara curtula* II. Release and inhibition of male copulatory behavior. **Journal of Chemical Ecology**, 9, 13-31.
- Peschke, K. & Metzler, M. (1986). Cuticular hydrocarbons and female sex pheromones of the rove beetle, *Aleochara curtula* (Goeze) (Coleoptera: Staphylinidae). **Insect Biochemical**, 17, 167-178.
- Peschke, K. & Eisner, T. (1987). Defensive secretion of the tenebrionid beetle, *Blaps mucronata*: physical and chemical determinants of effectiveness. **Journal of Comparison Physiology**, 161, 377-388.
- Peschke, K., Friedrich, P., Kaiser, U., Franke, S. & Francke, W. (1999). Isopropyl (Z9)-hexadecenoate as a male attractant pheromone from the sternal gland of the rove beetle *Aleochara curtula* (Coleoptera: Staphylinidae). **Chemoecology**, 9, 47-54.
- Piffard, A. (1901). Steni gliding on the surface of water. **The Entomologist's monthly magazine**, 12, 99.
- Schierling, A., Seifert, K., Sinterhauf, S. R., Rieß, J. B., Rupperecht, J. C. & Dettner, K. (2013). The multifunctional pygidial gland secretion of the Steninae (Coleoptera: Staphylinidae): ecological significance and evolution. **Chemoecology**, 23, 45-57.

- Schildknecht, H., Berger, D., Krauss, D., Connert, J., Gehlhaus, J. & Essensbreis, H. (1976). Defense chemistry of *Stenus comma* (Coleoptera: Staphylinidae). **Journal of Chemical Ecology**, 2, 1-11.
- Schomann, A., Afflerbach, K. & Betz, O. (2008). Predatory behaviour of some Central European pselaphine beetles (Coleoptera: Staphylinidae: Pselaphinae) with descriptions of relevant morphological features of their heads. **European Journal of Entomology**, 105, 889–907.
- Schneider, D. (1969). Insect olfaction: Deciphering system for chemical messages. **Science**, 163, 1031-1037.
- Showers, J. A. & Kistner, D. H. (1977). The natural history of the myrmecophilus tribe Pygostenini (Coleoptera: Staphylinidae) section 4, glandular anatomy of the Pygostenini. **Sociobiology**, 2, 305-326.
- Solodovnikov, A., Yue, Y., Tarasov, S. & Ren, D. (2013). Extinct and extant rove beetles meet in the matrix: Early Cretaceous fossils shed light on the evolution of a hyperdiverse insect lineage (Coleoptera: Staphylinidae: Staphylininae). **Cladistics**, 29, 360–403.
- Song, J. H. & Ahn, K. J. (2013). Molecular phylogeny reveals multiple origins of seashore colonization in the genus *Aleochara* Gravenhorst (Coleoptera: Staphylinidae: Aleocharinae). **Invertebrate Systematics**, 27, 239–244.
- Steel, W. O. (1970). The larva of the genera of Omaliinae with particular references to the British fauna. **Transactions of the Royal Entomological Society of London**, 122, 1-47.
- Steidle, J. L. M. & Dettner, K. (1993). Chemistry and morphology of the tergal gland of freelifving adult Aleocharinae (Coleoptera: Staphylinidae) and its phylogenetic significance. **Systematic Entomology**, 18, 149-168.
- Steidle, J. L. M. & Dettner, K. (1995). The Chemistry of the Abdominal Gland secretion of Six Species of the Rove Beetle Genus *Bledius*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 23, 757-765.
- Stoeffler, M., Maier, T. S., Tolasch, T. & Steidle, J. L. M. (2007). Foreign-language skills in rove-Beetles? Evidence for chemical mimicry of ant alarm pheromones in myrmecophilous Pella beetles (Coleoptera: Staphylinidae). **Journal of Chemical Ecology**, 33, 1382-1392.
- Stoeffler, M., Boettinger, L., Tolasch, T. & Steidle, J. L. M. (2013). The Tergal Gland Secretion of the Two Rare Myrmecophilous Species *Zyras collaris* and *Z. haworthi* Coleoptera:

- Staphylinidae) and the Effect on *Lasius fuliginosus*. **Psyche: A Journal of Entomology**, 1-5.
- Thayer, M. K. (1985). The larva of *Brathinus nitidus* Leconte and systematic position of the genus (Coleoptera: Staphylinidae). **Coleopterists Bulletin**, 39, 174-184.
- Thayer, M. K. (2005). Staphylinidae Latreille, 1802. In 'Handbook of Zoology. Volume IV. Arthropoda: Insecta, Coleoptera, Beetles Volume 1: Morphology and Systematics'. (Eds R. G. Beutel and R. A. B. Leschen.) pp. 296–344. (Walter de Gruyter: Berlin, Germany).
- Thomas, J. C. (2009). A Preliminary Molecular Investigation of Aleocharine Phylogeny (Coleoptera: Staphylinidae). **Annal of Entomological Society of America**, 102, 189-195.
- Tsweet, M. S. (1906). **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft.**, 24, 384.
- Vane-Wright, R. I. (1976). A unified classification of mimetic resemblances. **Biological Journal of Linneus Society**, 8, 25–56.
- Vieira, J. S., Ribeiro-Costa, C. R. & Caron, E. (2014). Rove beetles of medical importance in Brazil (Coleoptera, Staphylinidae, Paederinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, 58, 244–260.
- Vorderman, A. G. (1901). Huiduitslag veroorzaakt door *Paederus peregrinus*, Fabr. Gennesk. **Tijdschr. Ned. Indie**, 21, 282–284.
- Wheeler, J. W., Happ, G. M., Araujo, J. & Pasteels, J. M. (1972). Dodecalactone from rove beetles. **Tetrahedron Letters**, 46, 4635-4638.
- Yamaoka, R. (1990). Chemical approach to understanding interactions among organisms. **Physiology and Ecology of Japan**, 27, 31–52.
- Yew, J. Y. & Chung, H. (2015). Insect pheromones: An overview of function, form, and discovery. **Progress in Lipid Research**, 59, 88–105.
- Yue, Y., Markkrancy, G. & Ren, D. (2012). A Mesozoic Species of *Anotylus* (Coleoptera, Staphylinidae, Oxytelinae) from Liaoning, China, With the Earliest Evidence of Sexual Dimorphism In Rove Beetles. **Journal of Paleontology**, 86, 508–512.

APÊNDICE

Lista I. Compostos identificados para espécies da subfamília Aleocharinae

Aleochara curtula Goeze

Feromônio: (Z)-9-hexadecenoato de isopropila; hexadecanoato de isopropila.

Atração: (Z)-7-heneicoseno; (Z)-7-tricoseno.

Defesa: 1-undeceno; dodecanal; 2-metil-1,4-benzoquinona; 2-metoxi-3-metil-1,4-benzoquinona; (Z)-4-trideceno; (Z)-5-tetradecenal; undecano.

Referências: Pesch & Metzler, 1982; Pesch, 1983; Pesch, 1986; Pesch *et al.*, 1999.

Atheta crassicornis Fabricius

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona; 2-metil-1,4-benzenodiol; 2-metoxi-3-metilhidroquinona; 2-metoxi-3-metil-1,4-benzoquinona; 1,4-dihidroxibenzeno; 4-etil octadecenoato; 4,6-etil octadecadienoato; dodecanal; decanal; undecano; tridecano; 1-heptadeceno.

Referência: Steidle *et al.*, 1993.

Atheta fungi (Gravenhorst)

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona; 1,4-benzoquinona.

Referência: Holldobler *et al.*, 1981.

Atheta pertyi (Heer)

Defesa: 2-metil-1,4-benzenodiol; 1,4-dihidroxibenzeno; etil-decanoato; etil-dodecanoato; undecano.

Referência: Steidle *et al.*, 1993.

Atheta sodalis (Erichson)

Defesa: 2-metil-1,4-benzenodiol; 2-metoxi-3-metilhidroquinona; etil-decanoato; etil-dodecanoato; undecano.

Referência: Steidle *et al.*, 1993.

Autalia rivularis Gravenhorst

Defesa: 2-metil-1,4-benzenodiol; 2-metoxi-3-metilhidroquinona.

Referência: Steidle *et al.*, 1993.

Dinarda dentata Gravenhorst

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona; 2-metil-1,4-benzenodiol; 2-metoxi-3-metil-1,4-benzoquinona; 2-metoxi-3-metilhidroquinona; etil-octadecenoato; etil-octadecadienoato.

Referência: Steidle *et al.*, 1993.

Drusilla canaliculata Fabricius

Defesa: dodecanal; tetradecanal; 5-tetradecenal; 5,8-tetradecadienal; 2-hidroxi-3-metilhidroquinona; 2-metil-1,4-benzoquinona; 2-metoxi-3-metil-1,4-benzoquinona; 1,4-dihidroxibenzeno; 2-metil-1,4-hidroquinona.

Referência: Brand *et al.*, 1973.

Falagria thoracica Curtis

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona; 2-metil-1,4-benzenodiol; 2-metoxi-3-metil-1,4-benzoquinona; 2-metoxi-3-metilhidroquinona.

Referência: Steidle *et al.*, 1993.

Gyrophæna affinis Sahlberg

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona; 2-metil-1,4-benzenodiol; 2-metoxi-3-metil-1,4-benzoquinona; 2-metoxi-3-metilhidroquinona.

Referência: Steidle *et al.*, 1993.

Gyrophæna fasciata (Marsham)

Defesa: 2-metil-1,4-benzenodiol; 2-metoxi-3-metilhidroquinona; hexadecanoato de etila; ácido etil octadecanóico; etil-octadecenoato; etil-octadecadienoato.

Referência: Steidle *et al.*, 1993.

***Gyrophæna pulchella* Heer**

Defesa: 2-metil-1,4-benzenodiol; 2-metoxi-3-metilhidroquinona; etil octadecenoato.

Referência: Steidle *et al.*, 1993.

***Leptusa pulchella* Mannerheim**

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona; 2-metil-1,4-benzenodiol; 2-metoxi-3-metil-1,4-benzoquinona; 2-metoxi-3-metilhidroquinona; hexadecanoato de etila; etil-heptadecanoato; etil-heptadecenoato; ácido etil-octadecanóico; etil-octadecenoato; etil-octadecadienoato; 3-metilbutilpropionato.

Referência: Steidle *et al.*, 1993.

***Lomechusa strumosa* (Gravenhorst)**

Defesa: Tridecano.

Referência: Blum *et al.*, 1971.

***Oxypoda alternans* (Gravenhorst)**

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona; 2-metil-1,4-benzenodiol; 2-metoxi-3-metil-1,4-benzoquinona; 2-metoxi-3-metilhidroquinona; 1,4-dihidroxibenzeno; hexadecanoato de etila; ácido etil octadecanóico; etil-octadecenoato; etil-octadecadienoato; etil-dodecanoato; decanal; pentadecano.

Referência: Steidle *et al.*, 1993.

***Oxypoda vittata* Märkel**

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona.

Referência: Holldobler *et al.*, 1981.

Pella comes

Mimetismo: 3,7-dimetil-6-octanal.

Referência: Kistner, 1971.

***Pella funestus* Gravenhorst**

Defesa: 1,4-benzoquinona; decano; 2-metil-1,4-benzoquinona; 1-undeceno; 2-metoxi-3-metil-1,4-benzoquinona; 1-trideceno; tridecano; 2-metil-1,4-hidroquinona; 1,4-dihidroxibenzeno; dodecanal.

Mimetismo: undecano; 6-metil-5-2-heptenona.

Referência: Stoeffler *et al.*, 2007.

***Pella humeralis* Gravenhorst**

Defesa: 1,4-benzoquinona; decano; 2-metil-1,4-benzoquinona; 1-undeceno; 2-metoxi-3-metil-1,4-benzoquinona; 1-trideceno; tridecano; dodecanal.

Mimetismo: undecano; 6-metil-5-2-heptenona.

Referência: Stoeffler *et al.*, 2007.

Pella japonicus

Mimetismo: 3,7-dimetil-6-octanal.

Referência: Kistner, 1971.

***Placusa complanata* Erichson**

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona; 2-metil-1,4-benzenodiol; 2-heptanona.

Referência: Steidle *et al.*, 1993.

***Sipalia circellaris* (Gravenhorst)**

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona; 1,4-benzoquinona.

Referência: Holldobler *et al.*, 1981.

***Thamiaræa fuscicornis* (Broun)**

Defesa: undecano; 2-metil-1,4-benzoquinona; etil-decanoato.

Referência: Gnanasunderam *et al.*, 1981.

***Tramiathaea cornigera* (Broun)**

Defesa: undecano; 2-metil-1,4-benzoquinona; etil-decanoato.

Referência: Gnanasunderam *et al.*, 1981.

***Tramiathaea* sp.**

Defesa: undecano; 2-metil-1,4-benzoquinona; etil-decanoato.

Referência: Gnanasunderam *et al.*, 1981.

***Zyras collaris* Paykull**

Mimetismo: α -pineno, β -pineno, mirceno e limoneno.

Referência: Stoeffler *et al.*, 2013.

***Zyras comes* Sharp**

Mimetismo: 9-pentacoseno; pentacosano; 11-metilpentacosano; 13- metilpentacosano; 5-metilpentacosano; 3-metilpentacosano; hexacosano; 9-heptacoseno; heptacosano; 5-metilheptacosano; 7-metilheptacosano; 9-metilheptacosano; 11-metilheptacosano; 13-metilheptacosano; 11,15-dimetilheptacosano; 3-metilheptacosano; 4-metiloctacosano; 9-nonacoseno; nonacosano; 13-metilnonacosano; 15-metilnonacosano; 11-metilnonacosano; 5-metilnonacosano; 3-metilnonacosano; hentriacontano; 11-metilhentriacontano; 13-metilhentriacontano; 15-metilhentriacontano.

Referência: Akino, 2002.

***Zyras funestus* Gravenhorst**

Defesa: 2-metil-1,4-benzenodiol; 2-metoxi-3-metil-1,4-benzoquinona; 2-metoxi-3-metilhidroquinona; dodecanal; undecano; tridecano; pentadecano; 6-metil-5-2-heptenona.

Referência: Steidle *et al.*, 1993.

***Zyras haworthi* Stephens**

Mimetismo: α -pineno, β -pineno, mirceno e limoneno.

Referência: Stoeffler *et al.*, 2013.

***Zyras humeralis* Gravenhorst**

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona; 1,4-benzoquinona; ácido 3-metilbutanóico.

Referências: Holldobler *et al.*, 1981.

***Zyras laticolis* Markel**

Defesa: undecano; decano; tridecano; ácido 3-metilbutanóico; ácido 2-metilpropanóico.

Referência: Holldobler *et al.*, 1981.

***Zyras lugens* Gravenhorst**
Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona; 2-metil-1,4-benzenodiol; 2-metoxi-3-metilhidroquinona; 1,4-benzoquinona; 1,4-dihidroxibenzeno; dodecil acetato; dodecanal; undecano; tridecano; pentadecano; 6-metil-5-2-heptenona.

Referência: Steidle *et al.*, 1993.

Lista II. Compostos identificados para espécies da subfamília Omaliinae

***Anthophagus angusticollis* Mannerheim**

Defesa: ácido octanóico; nonadecano; benzonitrila; (E)-2-hexenal.

Referência: Detnner & Reissenweber, 1991.

***Eusphalerum abdominale* Gravenhorst**

Defesa: ácido 2-metilbutanóico; ácido 3-metilbutanóico; 2-hexenil-3-metilbutanoato; nonadecano; 2-hexenil tigolato; (E)-2-1-hexenol; (E)-2-hexenal.

Referência: Detnner & Reissenweber, 1991.

***Eusphalerum abdominale* Gravenhorst**

Defesa: ácido 3-metilbutanóico; (E)-2-hexenal.

Referência: Klinger & Maschwitz, 1977.

***Eusphalerum anale* Erichson**

Defesa: ácido 3-metilbutanóico; (E)-2-hexenal.

Referência: Klinger & Maschwitz, 1977.

***Eusphalerum florale* Panzer**

Defesa: 2-hexenil-3-metilbutanoato; ácido 2-metilbutanóico; ácido 3-metilbutanóico; (E)-2-1-hexenol; (E)-2-hexenal; 2-hexenil tiglato; (E)-4-oxo-2-hexenal.

Referência: Detnner & Reissenweber, 1991.

***Eusphalerum limbatum* Erichson**

Defesa: ácido 2-metilbutanóico; ácido 3-metilbutanóico; 2-hexenil-3-metilbutanoato; (E)-2-1-hexenol; (E)-2-hexenal; ácido hexanóico; 2-hexenil tiglato.

Referência: Detnner & Reissenweber, 1991.

***Eusphalerum longipenne* Erichson**

Defesa: ácido 3-metilbutanóico; (E)-2-hexenal.

Referência: Klinger & Maschwitz, 1977.

***Eusphalerum minutum* Fabricius**

Defesa: 2,3-dimetil-7-oxabicyclo[1,2,2]heptano-2,3-dicarboxílicoanhidrido; (R)-palasonina; (S)-palasonina; ácido 2-metilbutanóico; ácido 3-metilbutanóico; 2-hexenil-3-metilbutanoato; (E)-2-1-hexenol; (E)-2-hexenal; 2-feniletil-2-metilbutanoato; ácido 3-metilbutanóico; (E)-2-hexenal.

Referências: Klinger & Maschwitz, 1977; Detnner & Reissenweber, 1991; Fietz *et al.*, 2002.

***Eusphalerum ophthalmicum* Paykull**

Defesa: ácido 2-metilbutanóico; ácido 3-metilbutanóico; 2-hexenil-3-metilbutanoato; (E)-2-hexenil hexanoato; (E)-2-hexenal; ácido hexanóico.

Referência: Detnner & Reissenweber, 1991.

***Eusphalerum signatum* Märkel**

Defesa: octanal; 2-decenil tiglato; (E)-2-metil-2- ácido butenóico; 2-octenal; 2-decenal.

Referência: Detnner & Reissenweber, 1991.

***Eusphalerum sorbi* Gyllenhal**

Defesa: ácido 2-metilbutanóico; ácido 3-metilbutanóico; 2-hexenil-3-metilbutanoato; nonadecano; (E)-2-1-hexenol; (E)-2-hexenal.

Referência: Detnner & Reissenweber, 1991.

***Eusphalerum stramineum* Kraatz**

Defesa: ácido 2-metilbutanóico; ácido 3-metilbutanóico; 2-hexenil-3-metilbutanoato; (E)-2-hexenil hexanoato; nonadecano; (E)-2-1-hexenol; (E)-2-hexenal.

Referência: Detnner & Reissenweber, 1991.

***Eusphalerum torquatum* Marsham**

Defesa: 2-hexenil-3-metilbutanoato; ácido 2-metilbutanóico; ácido 3-metilbutanóico; (E)-2-1-hexenol; (E)-2-hexenal; 2-hexenil tiglato.

Referência: Detnner & Reissenweber, 1991.

***Lathrimaeum atrocephalum* Gyllenhal**

Defesa: ácido-2-metilpropanóico; octil-2-metilpropionato; octil-2-metilbutanoato; octanal; ácido 2-metilbutanóico; ácido 3-metilbutanóico; nonadecano; nonanal; octan-1-ol; ácido 2-octanóico.

Referência: Detnner & Reissenweber, 1991.

***Lathrimaeum unicolor* Marsham**

Defesa: ácido 2-metilpropanóico; octil-2-metilpropionato; octil-2-metilbutanoato; octil-3-metilbutanoato; octanal; ácido octanóico; ácido 2-metilbutanóico; nonanal; octan-1-ol; 2- ácido octanóico; heptanal.

Referência: Detnner & Reissenweber, 1991.

Levesta longelytrata

Defesa: 6-metil-5-2-heptenona; nonadecano; benzonitrila.

Referência: Detnner & Reissenweber, 1991.

***Omalium caesum* Gravenhorst**

Defesa: octil-3-metilbutanoato; octanal; ácido octanóico; ácido 3-metilbutanóico; 1-octanol; ácido 2-metilbutanóico.

Referência: Detnner & Reissenweber, 1991.

***Omalium rivulare* Paykull**

Defesa: octil-3-metilbutanoato; octanal; ácido octanóico; ácido 3-metilbutanóico; 2,6,6-trimetilbiciclo[3.1.1]2-hepteno; 6,6-dimetil-2-metilenobiciclo[3.1.1]heptano; 1R-(1R,4E,9S)-4,11,11-trimetil-8-metilenobiciclo[7.2.0]4-2undeceno.

Referência: Detnner & Reissenweber, 1991.

***Omalium rugatum* Mulsant & Rey**

Defesa: octil-3-metilbutanoato; ácido 3-metilbutanóico; 2-metilbutil-2-metilbutanoato; ácido octanóico; ácido 2-metilbutanóico.

Referência: Detnner & Reissenweber, 1991.

***Phleonomus pusillus* Gravenhorst**

Defesa: ácido 2-metilbutanóico; ácido 3-metilbutanóico; (E)-2-hexenal; 2-hexenil tigolato; 2-metilbutil-2-metilbutanoato.

Referência: Detnner & Reissenweber, 1991.

***Phyllostrepa floralis* Paykull**

Defesa: (E)-2-hexenil butirato; hexenil butirato; ácido butírico; (E)-2-1-hexenol; (E)-2-hexenal; (E)-2-ácido hexenóico.

Referência: Detnner & Reissenweber, 1991.

Lista III. Compostos identificados para espécies da subfamília Oxytelinae

***Bledius arenarius* Schneider**

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona, 2-metil-1,4-benzenodiol; ácido decanóico; ácido octanóico; octanoato de octilo.

Referência: Steidle & Dettner, 1995.

***Bledius dissimilis* Erichson**

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona; 2-metil-1,4-benzenodiol; 1-undeceno; 1-trideceno; 5-octil-di-hidrofuran-2(3H)-ona; 5-decil-di-hidrofuran-2 (3H) -ona; (Z)-3,7-dimetil-2,6-octadienal; (E)-3,7-dimetil-2,6-octadienal.

Referência: Steidle & Dettner, 1995.

***Bledius furcatus* Olivier**

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona; 2-metil-1,4-benzenodiol; 1-noneno 1-deceno; 1-undeceno; 1-trideceno; 5-hexil-di-hidrofuran-2 (3H) -ona; 5-octil-di-hidrofuran-2 (3H) -ona; (Z) -3,7-dimetil-2,6-octadienal; (E) -3,7-dimetil-2,6-octadienal.

Referência: Steidle & Dettner, 1995.

***Bledius mandibularis* Erichson**

Defesa: 1-undeceno; 2-metil-1,4-benzoquinona; (Z) -3,7-dimetil-2,6-octadienal; (E) -3,7-dimetil-2,6-octadienal; 5-octil-di-hidrofuran-2 (3H) -ona.

Referência: Wheeler *et al.*, 1972.

***Bledius opacus* Block**

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona; 2-metil-1,4-benzenodiol; 1-undeceno; 1-trideceno; 5-octil-di-hidrofuran-2 (3H) -ona; 3-metil-2-butenóico; ácido decanóico.

Referência: Steidle & Dettner, 1995.

***Bledius spectabilis* Kraatz**

Defesa: 1-noneno; 1-deceno; 1-trideceno; 2-metil-1,4-benzoquinona; (Z, E) -3,7-dimetil-2,6-octadienal; 5-hexil-di-hidrofuran-2 (3H) –ona; 5-heptil-di-hidrofuran-2 (3H) –ona; 5-octil-di-hidrofuran-2 (3H) –ona; 5-decil-di-hidrofuran-2 (3H) –ona; 5-decanolido; 2-metil-1,4-benzenodiol; acetato de decila; doacetato de decila; unacetato de decila.

Referência: Dettner & Schwinger, 1982.

***Bledius spectabilis* Kraatz**

Defesa: 1-undeceno; 2-metil-1,4-benzoquinona; (Z) -3,7-dimetil-2,6-octadienal; (E) -3,7-dimetil-2,6-octadienal; 5-octil-di-hidrofuran-2 (3H) –ona.

Referência: Wheeler *et al.*, 1972.

***Bledius subterraneus* Erichson**

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona; 2-metil-1,4-benzenodiol; 1-deceno; 1-undeceno; 1-trideceno; 5-octil-di-hidrofuran-2 (3H) –ona; 5-decil-di-hidrofuran-2 (3H) –ona; 3-metil-2-butenóico; ácido decanóico.

Referência: Steidle & Dettner, 1995.

***Bledius tricornis* Herbst**

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona; 2-metil-1,4-benzenodiol; 1-deceno; 1-undeceno; 1-trideceno; 5-octil-di-hidrofuran-2 (3H) –ona; 5-decil-di-hidrofuran-2 (3H) –ona; (Z) -3,7-dimetil-2,6-octadienal; (E) -3,7-dimetil-2,6-octadienal.

Referência: Steidle & Dettner, 1995.

***Coprophilus striatulus* Fabricius**

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona; 2-metil-1,4-hidroquinona; álcool isopropílico; dodecanoato; tetradecadienoato de isopropila; octadecanoato de isopropila; hexadecanoato de isopropila; dodecanoate de isopropila .

Referência: Dettner, 1984.

***Deleaster dichrous* Gravenhorst**

Defesa: sec-butil- (Z3)-dodecanoato; 2-metil-1,4-benzoquinona; 2-butil-decanoato; sec-butilundecanoato; sec-propil-(Z)-5-dodecanoato; sec-propil-(Z)-3-dodecanoato; 2-butil dodecanoato; sec-butil-(Z)-5-dodecanoato; 2-metil-1,4-benzenodiol.

Referência: Dettner *et al.*, 1985.

***Oxytelus piceus* Linnaeus**

Defesa: 5-decil-di-hidrofuran-2(3H) –ona; 5-decanolido; 2-metil-1,4-benzenodiol; acetato de decila; unacetato de decila; doacetato de decila; 1-noneno.

Referência: Dettner & Schwinger, 1982.

***Platystethus arenarius* Fourcroy**

Defesa: 1-deceno; 1-trideceno; 2-metil-1,4-benzoquinona; (Z,E)-3,7-dimetil-2,6-octadienal; 5-hexil-di-hidrofuran-2 (3H) –ona; 5-heptil-di-hidrofuran-2 (3H) –ona; 5-octil-di-hidrofuran-2 (3H) –ona; 5-decil-di-hidrofuran-2(3H) –ona; 5-decanolido; 2-metil-1,4-benzenodiol; acetato de decila; unacetato de decila; doacetato de decila; 1-noneno.

Referência: Dettner & Schwinger, 1982.

***Syntomium aeneum* Müller**

Defesa: 2-metil-1,4-benzoquinona.

Referência: Dettner, 1991.

Lista IV. Compostos identificados para espécies da subfamília Paederinae

***Paederus columbinus* Laporte**

Defesa: *Pederin; Pederone.*

Referência: Cardani *et al.*, 1967.

***Paederus floridanus* Austin**

Defesa: ((1R,3S)-2,2,3,4-tetrametilciclopentil)-metanol.

Referência: Eisner *et al.*, 1986.

***Paederus fuscipes* Curtis**

Defesa: *Pederin; Pederone; Pseudopederin.*

Referências: Cardani *et al.*, 1967; Kellner *et al.*, 1995.

***Paederus littoralis* Gravenhorst**

Defesa: *Pederin.*

Referência: Cardani *et al.*, 1965.

***Paederus melanurus* Aragona**

Defesa: *Pederin; Pederone.*

Referência: Cardani *et al.*, 1967.

***Paederus riparius* Linnaeus**

Defesa: *Pederin.*

Referência: Kellner *et al.*, 1995.

***Paederus rubrothoracicus* Goez**

Defesa: *Pederin.*

Referência: Cardani *et al.*, 1965.

***Paederus rufocyanus* Bernhauer**

Defesa: *Pederin.*

Referência: Cardani *et al.*, 1965.

Lista V. Compostos identificados para espécies da subfamília Proteininae

***Megarthus denticollis* Beck**

Defesa: benzonitrila; nonanal.

Referência: Dettner & Reissenweber, 1991.

***Megarthus sinuatocollis* Lacordaire**

Defesa: nonanal; hexadecil-2-metilbutanoato; 2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]2-hepteno; benzonitrila.

Referência: Dettner & Reissenweber, 1991.

***Proteinus atomarius* Erichson**

Defesa: ácido 2-metilbutanóico; 2-1-metilbutanol; 2-metilpropil 2-metilbutanoato; 2-metilbutil-2-metilbutanoato; (E)-4-oxo-2-hexenal.

Referência: Dettner & Reissenweber, 1991.

***Proteinus brachypterus* Fabricius**

Defesa: 2-metilpropil 2-metilbutanoato; 2-metilbutil-2-metilbutanoato; hexadecil-2-metilbutanoato; octadecil-2-metilbutanoato.

Referência: Dettner & Reissenweber, 1991.

Lista VI. Compostos identificados para espécies da subfamília Staphylininae

***Cafius quadriimpressus* White**

Defesa: 6,7-dihidro-4,7-dimetil-5H-2-piridina; pentadecano.

Referência: Gnanasunderam *et al.*, 1981.

***Creophilus erythrocephalus* Fabricius**

Defesa: 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído.

Referência: Bellas *et al.*, 1974.

***Creophilus maxillosus* Linnaeus**

Defesa: 3-metilbutan-1-ol; 3-metilbutil acetato; 6,7-dihidro-4,7-dimetil-5H-2-piridina; 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído; hexahidro-4,7-dimetilciclopenta[c]piran-1(3H)-ona; 3-metilbutan-1-ol; 3-metilbutil acetato; 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído; 6,7-dihidro-4,7-dimetil-5H-2-piridina; (4à,4aà,7à,7aà)-hexahidro-4,7-dimetilciclopenta[c]piranona; (E)-8-oxo-3,7-dimetil-6-octenil acetato.

Referência: Huth & Dettner, 1990.

***Eulissus orthodoxus* Olliff**

Defesa: 3-metilbutanal; 3,7-dimetil-6-octenal; 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído; (E)-3,7-dimetil-2,6-octadienal.

Referência: Bellas *et al.*, 1974.

***Hesperus semirufus* Fauvel**

Defesa: 6,7-dihidro-4,7-dimetil-5H-2-piridina; tridecano; pentadecano.

Referência: Bellas *et al.*, 1974.

***Ocypus aeneocephalus* DeGeer**

Defesa: hexahidro-4,7-dimetilciclopenta[c]piran-1(3H)-ona; 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído.

Referência: Huth & Dettner, 1990.

***Ocypus fuscatus* Gravenhorst**

Defesa: hexahidro-4,7-dimetilciclopenta[c]piran-1(3H)-ona; 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído.

Referência: Huth & Dettner, 1990.

***Ocypus melanarius* Heer**

Defesa: 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído; 6,7-dihidro-4,7-dimetil-5H-2-pirindina.

Referência: Huth & Dettner, 1990.

Ocypus micus

Defesa: 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído.

Referência: Huth & Dettner, 1990.

***Ocypus olens* Müller**

Defesa: 4-metilhexan-3-ona; 4-metilheptan-3-ona; 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído; 2-(1-formilvinil)-5-metilciclopentanocarbaldeído.

Referência: Huth & Dettner, 1990.

***Ocypus similis* Fabricius**

Defesa: 4-metilhexan-3-ona; 4-metilheptan-3-ona; 6,7-dihidro-4,7-dimetil-5H-2-pirindina; 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído.

Referência: Huth & Dettner, 1990.

***Ontholestes murinus* Linnaeus**

Defesa: (6R,8S)-2,2,8-trimetil-1,7-dioxaspiro[5.5]undecano; (E,E)-2,8-dimetil-1,7-dioxaspiro[5.5]undecano; heptan-2-ona; (E,E)-2,8-dimetil-1,7-dioxaspiro[5.5]undecano; 6,7-dihidro-4,7-dimetil-5H-2-piridina; 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído; 2-(1-formilvinil)-5-metilciclopentanocarbaldeído; 2,2,8-trimetil-1,7-dioxaspiro[5.5]undecano.

Referência: Huth & Dettner, 1990.

***Ontholestes tessellatus* Geoffroy**

Defesa: (2S,6R,8S)-(E,E)-2,8-dimetil-1,7-dioxaspiro[5.5]undecano; (E,E)-2,8-dimetil-1,7-dioxaspiro[5.5]undecano; 6,7-dihidro-4,7-dimetil-5H-2-pirindina; 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído; 2-(1-formilvinil)-5-metilciclopentanocarbaldeído.

Referência: Huth & Dettner, 1990.

Parabemus fossor Scopoli

Defesa: etil hexadecenoato; etil octadecenoato; 6,7-dihidro-4,7-dimetil-5H-2-piridina; 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído; tetrahidro-4,7-dimetilciclopenta[c]piranona.

Referência: Huth & Dettner, 1990.

Philonthus politus Linnaeus

Defesa: 6,7-dihidro-4,7-dimetil-5H-2-piridina; tridecano; pentadecano; 6,7-dihidro-4,7-dimetil-5H-2-piridina; tridecano; pentadecano.

Referências: Bellas *et al.*, 1974; Gnanasunderam *et al.*, 1981.

Philonthus sp.

Defesa: 6,7-dihidro-4,7-dimetil-5H-2-piridina; 5-(1-formiletil)-2-metil-2-ciclopenteno-1-carbaldeído; (E,E)-2,6-dimetil-2,6-octadiene-1,8-diol; (3S,8S)-2-metil-5-(1-formiletil)-1-ciclopenteno-1-carbaldeído.

Referência: Dettner, 1983.

Staphylinus caesareus Cederhjelm

Defesa: (E,E)-2-etil-7-metil-1,6-dioxaspiro[4.5]decano; (Z,E)-2-etil-7-metil-1,6-dioxaspiro[4.5]decano; 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído; 2-(1-formilvinil)-5-metilciclopentanocarbaldeído.

Referência: Huth & Dettner, 1990.

Staphylinus dimidiaticornis Gemminger

Defesa: 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído; 2-(1-formilvinil)-5-metilciclopentanocarbaldeído; 5-metilhexan-3-ona; 5-metilhexan-3-ol.

Referência: Huth & Dettner, 1990.

Staphylinus erythropterus Linnaeus

Defesa: 1-metilciclopenteno; 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído.

Referência: Huth & Dettner, 1990.

Staphylinus olens Müller

Defesa: 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído; 4-metilhexan-3-ona; 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído.

Referências: Abou-Donia *et al.*, 1971; Fish & Pattenden, 1975.

Thyreocephalus lorquini Fauvel

Defesa: 3,7-dimetil-6-octenal; 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído; (E)-3,7-dimetil-2,6-octadienal; 3-metilbutanal.

Referência: Bellas *et al.*, 1974.

Thyreocephalus orthodoxus Olliff

Defesa: 3,7-dimetil-6-octenal; 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído; (Z,E)-3,7-dimetil-2,6-octadienal; 2-metil-5-(1-oxopropan-2-il)-ciclopentanocarbaldeído; 3,7-dimetil-6-octenal.

Referências: Bellas *et al.*, 1974; Gnanasunderam *et al.*, 1981.

Xantholinus glaber Norden

Defesa: 6-metil-5-hepten-2-ona; 6-metil-5-hepten-2-ol.

Referência: Dettner, 1986.

Lista VII. Compostos identificados para espécies da subfamília Steninae

Dianous coeruleus Gyllenhal

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2]octano; 2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno.

Referência: Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus bifoveolatus* Gyllenhal**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2.]octano.

Referência: Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus biguttatus* Linnaeus**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina; 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2.]octano; 2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno; 6-metil-5-hepten-2-ona.

Referência: Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus bimaculatus* Gyllenhal**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina; 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2.]octano; 2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno; (2R,3R)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2S,3R)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2S,3S)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2R,3S)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina.

Referência: Lusebrink *et al.*, 2007; Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus binotatus* Ljungh**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina; 3-(2-metil-1-butenil)-piperidina; 3-(2-metil-1-propenil)-piperidina; 2-sec-butil-1-oxa-5-azaspiro[2.5]oct-4-eno; (E)-3-(2-metil-1-butenil)-piperidina; (Z)-3-(2-metil-1-butenil)-piperidina; 3-(1-isobutenil)-piperidina; N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina.

Referência: Lusebrink *et al.*, 2009; Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus bipunctatus* Erichson**

Defesa: 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2.]octano; 6-isopropenil-2-metil-1-ciclohexenol; 6-metil-5-hepten-2-ona.

Referência: Schildknecht, 1970.

***Stenus boops* Ljungh**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina; 2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno; 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2.]octano.

Referência: Lang *et al.*, 2012.

***Stenus brunnipes* Stephens**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina.

Referência: Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus cicindeloides* Schalle**

Defesa: 3-(2-metil-1-propenil)-piperidina; N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina 3-(2-metil-1-butenil)-piperidina; 2-sec-butil-1-oxa-5-azaspiro[2.5]oct-4-eno; (2S,3S,1S)-2-sec-butil-1-oxa-5-azaspiro[2.5]oct-4-eno; (E)-3-(2-metil-1-butenil)-piperidina; (Z)-3-(2-metil-1-butenil)-piperidina; (E)-3-(2-metil-1-butenil)-piperidina; (Z)-3-(2-metil-1-butenil)-piperidina; 3-(1-isobutenil)-piperidina; N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina.

Referência: Lusebrink *et al.*, 2009; Mueller *et al.*, 2012; Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus circularis* Gravenhorst**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina 2,6,6-Trimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno; 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2.]octano.

Referência: Lang *et al.*, 2012.

***Stenus clavicornis* Scopoli**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina 2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno; (2R,3R)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2S,3R)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2R,3S)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina.

Referência: Lusebrink *et al.*, 2007; Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus comma* LeConte**

Defesa: (2R,3R)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2S,3R)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2S,3S)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2R,3S)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; 3-hidroxi-4,5-dimetoxibenzenóico ácido; 4-hidroxi-4,5-dimetoxibenzenóico ácido; (2R,3R)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2S,3R)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2S,3S)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2R,3S)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2.]octano; 6-metil-5-hepten-2-ona; N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; 6-isopropenil-2-metil-1-ciclohexenol.
Referência: Schildknecht *et al.*, 1976; Enders, 1993; Bitzer *et al.*, 2004; Lusebrink *et al.*, 2007; Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus flavipalpis* Thomas**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina 2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno.

Referência: Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus flavipes* Stephens**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina.

Referência: Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus fornicatus* Stephens**

Defesa: (E)-3-(2-metil-1-butenil)-piridina; (Z)-3-(2-metil-1-butenil)-piridina; N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina.

Referência: Lusebrink *et al.*, 2009.

***Stenus fossulatus* Erichson**

Defesa: N-etil-3-isobutilpiperidina; 2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2.] octano; N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina.

Referência: Lang *et al.*, 2012.

***Stenus fulvicornis* Stephens**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2.]octano; N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina (2R,3R)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2S,3R)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2S,3S)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2R,3S)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina.

Referência: Lusebrink *et al.*, 2007; Lusebrink *et al.*, 2009; Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus humilis* Erichson**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina 2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno.

Referência: Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus impressus* Germar**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina 2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno; 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2.]octano.

Referência: Lang *et al.*, 2012.

***Stenus junio* Paykull**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2.]octano; (2R,3R)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2S,3R)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2S,3S)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2R,3S)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina.

Referência: Lusebrink *et al.*, 2007; Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus latifrons* Erichson**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2.]octano; N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina.

Referência: Lusebrink *et al.*, 2009; Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus melanarius* Stephens**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina.

Referência: Lang *et al.*, 2012.

***Stenus nitidiusculus* Stephens**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina; 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2.]octano.

Referência: Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus picipes* Stephens**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina 2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno; 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2.]octano.

Referência: Lang *et al.*, 2012.

***Stenus pinguis* Casey**

Defesa: (E)-3-(2-metil-1-butenil)-piridina; (Z)-3-(2-metil-1-butenil)-piridina N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina.

Referência: Lusebrink *et al.*, 2009.

***Stenus providus* Erichson**

Defesa: (2R,3R)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2S,3R)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2S,3S)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; (2R,3S)-N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina.

Referência: Lusebrink *et al.*, 2007.

***Stenus pubescens* Stephens**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina 3-(2-metil-1-butenil)-piridina; 3-(2-metil-1-propenil)-piridina (E)-3-(2-metil-1-butenil)-piridina; (Z)-3-(2-metil-1-butenil)-piridina 3-(1-isobutenil)-piridina; N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina.

Referência: Lusebrink *et al.*, 2009; Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus similis* Herbst**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina 3-(2-metil-1-butenil)-piridina; 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2.]octano 3-(2-metil-1-propenil)-piridina; (E)-3-(2-metil-1-butenil)-piridina; (Z)-3-(2-metil-1-butenil)-piridina; N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina.

Referência: Lusebrink *et al.*, 2009; Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus solutus* Erichson**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina 3-(2-metil-1-butenil)-piridina; 2-sec-butil-1-oxa-5-azaspiro[2.5]oct-4-eno 3-(2-metil-1-propenil)-piridina; (2S,3S,1S)-2-sec-butil-1-oxa-5-azaspiro[2.5]oct-4-eno; (E)-3-(2-metil-1-butenil)-piridina; (Z)-3-(2-metil-1-butenil)-piridina; (E)-3-(2-metil-1-butenil)-piridina; (Z)-3-(2-metil-1-butenil)-piridina; 3-(1-isobutenil)-piridina; N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina.

Referência: Lusebrink *et al.*, 2009; Mueller *et al.*, 2012; Schierling *et al.*, 2013.

***Stenus stigmula* Erichson**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina.

Referência: Lang *et al.*, 2012.

***Stenus tarsalis* Ljungh**

Defesa: N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina; N-etil-3-isobutilpiperidina; 3-(2-metil-1-butenil)-piridina; 3-(2-metil-1-propenil)-piridina; (E)-3-(2-metil-1-butenil)-piridina; (Z)-3-(2-metil-1-butenil)-piridina; N-etil-3-(2-metilbutil)-piperidina.

Referência: Lusebrink *et al.*, 2009; Schierling *et al.*, 2013.

CAPÍTULO I: PARTE 2

Tergal Gland Secretion of the rove beetles *Aleochara pseudochrysorrhoea* Caron, Mise & Klimaszewski, 2008 (Staphylinidae: Aleocharinae): chemical composition and biological roles

RESUMO

Aleochara pseudochrysorrhoea, assim como outras espécies de Aleocharine, possui um complexo glandular denominado glândula tergal. Geralmente, secreções oriundas deste complexo glandular são uma mistura de hidrocarbonetos, aldeídos e quinonas. Estes compostos são conhecidos principalmente por possuir função defensiva. O conhecimento sobre funções secundárias deste complexo é escasso. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a composição química e funções biológicas da glândula tergal em *Aleochara pseudochrysorrhoea*. Os indivíduos utilizados neste estudo foram coletados em Curitiba, Paraná, Brasil. Adultos foram alimentados com primeiro e segundo instar de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) Diptera. O primeiro instar larval de *A. pseudochrysorrhoea* foi criado em potes plásticos cobertos com terra vegetal e pupas de *S. chlorogaster* para o parasitismo. As glândulas tergalis de machos e fêmeas de *A. pseudochrysorrhoea* foram extraídas de espécimes virgens com mais de 21 dias de idade, sacrificadas em freezer (30 min a -17 °C). Secreções da glândula tergal foram analisadas pela técnica de CG/EM (cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas) impacto de elétrons. Com base nas análises de CG/EM foram identificados onze compostos nas secreções da glândula tergal de macho e fêmea de *A. pseudochrysorrhoea*: decano; 2-metilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; undec-4-eno; undecano; 2-metoxi-3-metilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; dodecano; (Z)-tridec-4-eno; (Z)-tridec-6-eno; tridecano; dodecanal e (Z)-tetradec-9-enal. Foi observado em laboratório que as secreções presentes na glândula tergal de fêmeas de *A. pseudochrysorrhoea* dependendo da concentração agem como gatilho iniciando o comportamento de cópula em machos. A dose mais eficiente em iniciar a resposta de cópula em machos foi 15µl (de um extrato com uma glândula tergal em 100µl), correspondendo a 84% de respostas positivas (N=55). Além disso, secreções da glândula tergal de machos agem como gatilhos iniciando o comportamento de cópula em outros machos. Os compostos químicos presentes nas secreções da glândula tergal de *A. pseudochrysorrhoea* possuem, além de funções defensivas, possui um papel importante na comunicação química dessa espécie, desempenhando um importante papel no sistema copulatório e nas competições intraespecíficas entre machos.

Palavras chave: Compostos químicos, comportamento de cópula, quinonas, hidrocarbonetos.

Abstract

Aleochara pseudochrysorrhoea as other Aleocharinae species have a glandular complex known as tergal gland. Generally, the secretion of this gland is a mixture of hydrocarbons, aldehyde and quinones and have been demonstrated to possess defensive function. Little is known about secondary function of this complex in Aleocharinae species. Therefore, the aim of this work was to study the chemical composition and the function of *Aleochara pseudochrysorrhoea* tergal gland secretion. *Aleochara pseudochrysorrhoea* species were collected in animal carcass in Curitiba, Paraná state, Brazil. Adults were fed with first and second larval instar of *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) Diptera. The first larval instar of *A. pseudochrysorrhoea* were reared in plastic boxes and *Sarconesia chlorogaster* puparia was offered as hosts in order to obtain the adults. Male and female tergal gland secretion were extract from virgins beetles freshly killed by freezing (30 min at -17 °C). Tergal gland secretion analysis were carried out by GC/MS (electron impact ionization). All bioassays were performed with virgin male and female more than 21 days old, which were separate after emergency. Using the GC/MS analysis it was identified eleven compounds in tergal gland secretion: decane, 2-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione, undec-4-ene, undecane, 2-methoxy-3-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione, dodecane, (*Z*) tridec-4-ene, (*Z*) tridec-6-ene, tridecane, dodecanal, (*Z*) tetradec-9-enal. Female tergal gland secretion is affective in initiate male copulatory response depending on concentration, the most effective dose in release male copulatory behavior was 15µl (from a extract with one female gland in 100 µl), corresponding to 84% of positive responses (N=55). Also male tergal gland secretion was able to release the same reaction. The chemical compounds presents in tergal gland secretion of *Aleochara pseudochrysorrhoea* possess defensive function and and important play on chemical communication. This complex is able to initiate a male copulatory behavior and play in important function in male intraspecific competition.

Keywords: Tergal gland, defensive compounds, quinones, hydrocarbons, mating behavior.

1. Introduction

Adults and larvae of *Aleochara* spp. are usually found in fly-infested habitats such as animal droppings, carrion and decaying organic matter as forest litter, mushrooms, fermented fruit and decaying seaweed. *Aleochara* spp. are known as parasitoids of cyclorrhaphous dipteran pupae (Klimaszewski & Jansen 1993; Maus *et al.*, 1998; Caron *et al.*, 2008, Silva & Zarbin, 2016) and could be considered an important natural fly regulator because adults prey on eggs, larvae and pupae of dipterous species. It makes this group important for ecological and forensic studies (Peschke & Fuldner 1977; Klimaszewski 1984; Klimaszewski & Jansen 1993; Souza & Linhares 1997; Maus *et al.*, 1998; Tabor *et al.*, 2005; Mise *et al.*, 2007).

Most of Aleocharinae species possess a glandular complex known as tergal gland, which is a bilobate reservoir with a bright yellow color and a characteristic pungent odor. This complex is formed by an invagination of the intersegmental membrane between the sixth and seventh abdominal tergites (Fig. 1) (Peschke & Metzler 1982; Steidle & Dettner, 1993; Navarrete-Heredia *et al.*, 2002). The secretion from the tergal gland is a mixture of hydrocarbons, aldehydes and quinones. It has been reported that when Aleocharinae beetles are disturbed, they bend their abdomen towards the aggressor and discharge the secretion from the tergal gland as defense (Jordan, 1913; Pasteels, 1968; Blum *et al.*, 1971; Brand *et al.*, 1973; Gnanasuderam *et al.*, 1981; Peschke & Metzler, 1982; Steidle & Dettner, 1993). However, Peschke (1983) demonstrated that the secretion from the tergal gland of female *Aleochara curtula* acts as an aphrodisiac stimulating grasping reaction in males, which is the second step of mating sequence behavior of this species.

Aleochara pseudochrysorrhoea is an abundant species around Curitiba area (Paraná State, Brazil). This species can be easily collected in animal carcasses and it is an important fly regulator in this area (Caron *et al.*, 2008; Da Silva & Zarbin, 2016). Even though mating behavior have been observed in many Staphylinidae spp., little is known about the function of volatile compounds mediating reproduction of this group (Peschke, 1978). *Aleochara curtula* Goeze is the only species of the subfamily Aleocharinae that has the volatiles that mediate the mating behavior system studied (Peschke *et al.*, 1999). In this way, the aim of this work was to investigate the chemical composition and the function of the tergal gland secretion (TGS) of *Aleochara pseudochrysorrhoea*.

2. Experimental

2.1 Laboratory cultures

Aleochara pseudochrysorrhoea adults were collected in animal carcasses in the *Centro Politécnico* campus of the Federal University of Paraná (UFPR), located in Curitiba-PR, Brazil (S25.45, W49.23). Rearing was established in laboratory by placing adults in plastic boxes (20 x 20 cm) containing smaller plastic boxes with moistened soil for oviposition. Adults were fed with first and second larval instar of *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). The first instar larvae of *A. pseudochrysorrhoea* were reared in plastic boxes (10 x 10 cm) filled with moistened soil and *Sarconesia chlorogaster* pupae was offered as hosts. Immediately after the emergence of adults, beetles were separated by sex and kept in groups of ten individuals in plastic boxes (20 x 20 cm) with moistened filter paper. Beetles were kept in a controlled environmental chamber at 25 °C, with photoperiod of 12 hours at the Zoology Department of UFPR. We followed the rearing methodology of Peschke (1978) and Silva & Zarbin (2016).

2.2 Tergal gland secretion extraction

Male and female tergal gland secretions (TGS) were extracted from freeze killed virgin beetles of at least 21 days old (30 min at -17 °C), methodology follow Peschke, (1983). The extractions were performed under a Zeiss Discovery V8 stereoscopic microscope. Lateral incisions were done on both sides of beetles abdomen, the tergal gland located in the sixth and seventh abdominal tergites was removed (Figure 1) and immediately immersed in 100 µl of hexane during 45 minutes. The extracts were stored at -17 °C until analyses.

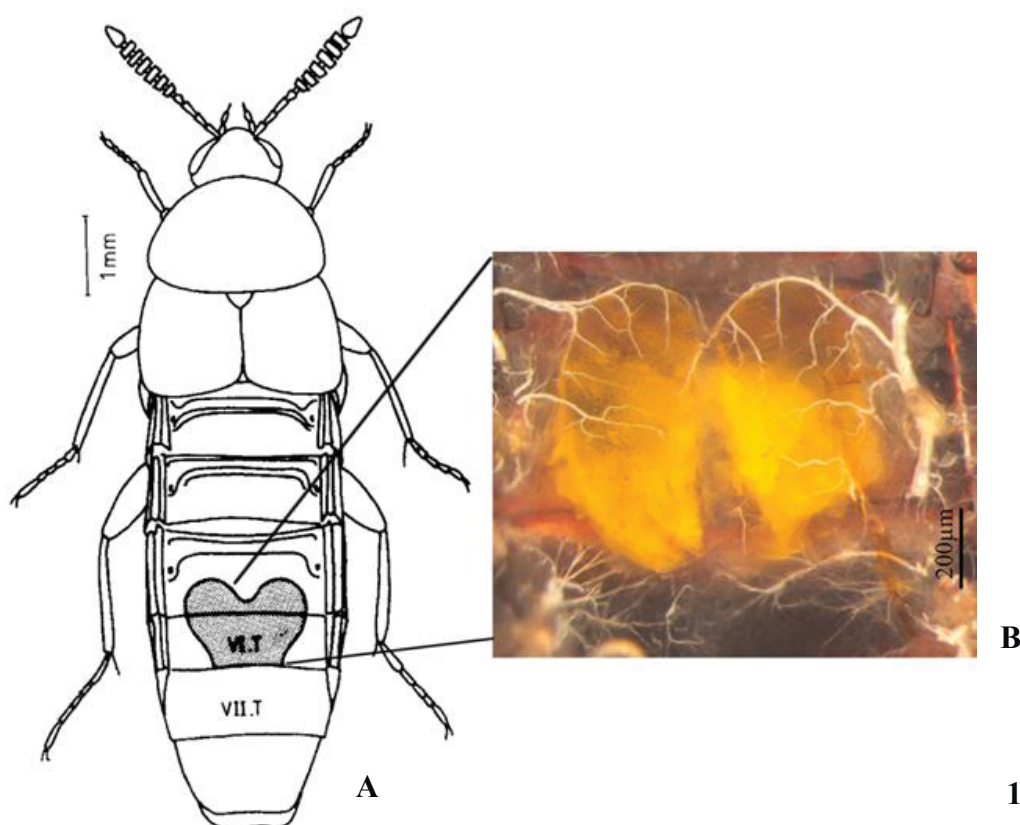


Figure 1. **A**, schematic drawn of the *Aleochara* specimen showing the tergal gland reservoir in dorsal view Peschke (1982). **B**, tergal gland reservoir of *Aleochara pseudochrysorrhoea* in dorsal view in glycerin.

2.3 Chemical analyses

The chemical identification in this study was performed in collaboration with the Prof. Dr. Diogo Montes Vidal (UFMG) and the graduation student Leonardo Figueiredo (UFPR). Structure elucidations of compounds were performed by a Shimadzu GC2010 gas chromatograph coupled to a Shimadzu QP2010 Plus spectrometer with electron impact ionization. The injector was operated in the splitless mode, at 250 °C. A DB-5 capillary column (Agilent Technologies; 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) was used, with the column temperature maintained at 50 °C for 1 min, before increasing to 270 °C at a rate of 7 °C min⁻¹, which was maintained for 5 min.

Quantitative determination for all extract components was done using nonadecane as internal standard. Retention indexes (RT) were calculated on a DB-5 column using commercial standards of alkanes (C10 to C26 10ng/μl) as reference. Equipment parameters as described

above. GC coupled with Fourier transform infrared spectroscopy (GC/FTIR) analyses were performed in a Shimadzu GC-2010 equipped with a RTX-5 column (30 m x 0.25 mm d.i; 0,25 μm , Restek Chromatography Products, USA) (same conditions as described above), coupled to a DiscovIR-GC spectrometer (DANI Instruments, Marlborough, Massachusetts, USA), with scan range of 4000-750 cm^{-1} and resolution of 8 cm^{-1} .

2.3.1 Micro-derivatization

2.3.1.1 Methylthiolation

A stock solution of iodine was prepared in carbon disulfide (2 mL; 5% w/w). In an ampoule, it was added 10 μL of dimethyl disulfide (Sigma-Aldrich, USA), 10 μL of the previously prepared iodine solution, and 10 μL of the crude natural extract. The ampoule was sealed and the mixture was stirred at room temperature during 12 hours. The resulting solution was washed with a 10% solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ and filtered over anhydrous sodium sulfate prior to GC-MS analysis (Vidal *et al.*, 2016).

2.4 Structural confirmation

The confirmation of compounds structures was performed through co-injection with synthetic standards. Decane (**1**), 2-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione (**2**), undecane (**4**), dodecane (**6**), tridecane (**9**) and dodecanal (**10**) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wisconsin, USA). The structure of 2-methoxy-3-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione (**5**) was proposed by comparison of the mass spectra and retention index previously described in Peschke & Metzler (1982) and Kirkemo & White, 1985. The unsaturated hydrocarbons (*Z*)-undec-4-ene (**3**), (*Z*)-tridec-4-ene (**7**) and (*Z*)-tridec-6-ene (**8**) were synthesized by Wittig reactions, starting from different aldehydes and bromides as described below (Silverstein *et al.*, 2014). The unsaturated aldehyde (*Z*) tetradec-9-enal (**11**) was synthesized following the methodology described by Xu *et al.* (2012).

2.5 Synthesis

General method for the Wittig reactions: Alkenes **3**, **7** and **8** were synthesized starting by adding the corresponding bromide (2.1 mmol) and triphenylphosphine (551 mg, 2.1 mmol) to an ampoule that was sealed and stirred for 24 hours at 100 °C. The resulting phosphonium salt was added without further purification to a reaction flask and dissolved in tetrahydrofuran (THF) (25 mL). The resulting solution was then stirred during 20 minutes and cooled to -78 °C, followed by the addition of *n*-butyllithium solution (2.2 mmol in hexane). The resulting solution was slowly warmed to room temperature and stirred during 30 minutes. The reaction was cooled to -78 °C again and a solution of the corresponding aldehyde (2.0 mmol in 5 mL of THF) was added drop-by-drop. The temperature was slowly warmed to room temperature and stirred overnight. The reaction was quenched with saturated NH₄Cl solution. The layers were separated and the aqueous layer was extracted with pentane. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated in vacuum. The crude product was purified by flash chromatography (pentane) yielding a mixture of the corresponding (*Z*)- and (*E*)-alkenes.

(*Z*)-undec-4-ene (3) Prepared according to procedure described above, starting from 1-bromobutane (287 mg, 2.1 mmol) and heptanal (228 mg, 2.0 mmol). Yield: 76%. **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)** δ : 0.89 (m, 3H), 1.20-1.52 (m, 20H), 1.59-1.73 (m, 2H), 1.96-2.07 (m, 4H), 2.33 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz), 5.23-5.44 (m, 2H). **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)** δ : 14.1, 17.1, 22.7, 25.4, 27.2, 27.2, 28.7, 28.8, 29.0, 29.2, 29.3, 29.4, 29.7, 29.8, 31.8, 119.9, 129.8, 130.0. **MS (EI, 70eV): *m/z* (%)**: 263 (M⁺, 14), 248 (3), 234 (18), 220 (26), 206 (19), 192 (18), 178 (18), 164 (22), 150 (32), 136 (70), 122 (87), 110 (22), 108 (16), 97 (41), 96 (26), 94 (14), 83 (52), 70 (36), 69 (74), 67 (30), 55 (100), 43 (34), 41 (64). **IR (ZnSe, ν_{\max})**: 720, 1034, 1457, 2247, 2856, 2924, 2953, 3007 cm⁻¹.

(*Z*)-tridec-4-ene (7) Prepared according to procedure described above, starting from 1-bromobutane (287 mg, 2.1 mmol) and nonanal (285 mg, 2.0 mmol). Yield: 77%. **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)** δ : 0.89 (m, 3H), 1.20-1.52 (m, 20H), 1.59-1.73 (m, 2H), 1.96-2.07 (m, 4H), 2.33 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz), 5.23-5.44 (m, 2H). **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)** δ : 14.1, 17.1, 22.7, 25.4, 27.2, 27.2, 28.7, 28.8, 29.0, 29.2, 29.3, 29.4, 29.7, 29.8, 31.8, 119.9, 129.8, 130.0. **MS (EI, 70eV): *m/z* (%)**: 263 (M⁺, 14), 248 (3), 234 (18), 220 (26), 206 (19), 192 (18), 178 (18), 164 (22), 150 (32), 136 (70), 122 (87), 110 (22), 108 (16), 97 (41), 96 (26), 94 (14), 83 (52), 70 (36), 69 (74), 67 (30), 55 (100), 43 (34), 41 (64). **IR (ZnSe, ν_{\max})**: 720, 1034, 1457, 2247, 2856, 2924, 2953, 3007 cm⁻¹.

(*Z*)-tridec-6-ene (8) Prepared according to procedure described above, starting from 1-bromobutane (346 mg, 2.1 mmol) and heptanal (228 mg, 2.0 mmol). Yield: 74%. **¹H NMR**

(300 MHz, CDCl₃)TM: 0.89 (m, 3H), 1.20-1.52 (m, 20H), 1.59-1.73 (m, 2H), 1.96-2.07 (m, 4H), 2.33 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz), 5.23-5.44 (m, 2H). **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)TM:** 14.1, 17.1, 22.7, 25.4, 27.2, 27.2, 28.7, 28.8, 29.0, 29.2, 29.3, 29.4, 29.7, 29.8, 31.8, 119.9, 129.8, 130.0. **MS (EI, 70eV): *m/z* (%):** 263 (M⁺, 14), 248 (3), 234 (18), 220 (26), 206 (19), 192 (18), 178 (18), 164 (22), 150 (32), 136 (70), 122 (87), 110 (22), 108 (16), 97 (41), 96 (26), 94 (14), 83 (52), 70 (36), 69 (74), 67 (30), 55 (100), 43 (34), 41 (64). **IR (ZnSe, *v*_{max}):** 720, 1034, 1457, 2247, 2856, 2924, 2953, 3007 cm⁻¹.

(*Z*)-tetradec-9-enal (II) A stock solution of (*Z*)-tetradec-9-en-1-ol in hexane (1 mL, 1000 ppm) was prepared. Pyridinium Chlorochromate (10 mg), CeliteTM (10 mg), and sodium acetate (1 mg) were added to a 1.5 mL glass vial. The mixture was suspended in dichloromethane (300 μL). A small portion (50 μL) of the resulting solution was transferred to a 1 mL ampoule. The previously prepared alcohol solution (10 μL) was added to the ampoule, which was sealed and stirred at room temperature during 4 hours. The resulting mixture was filtered over a silica gel/celite (1/1) column, which was then washed with dichloromethane. The resulting solution was concentrated to 100 μL under a gentle argon flow and analyzed by GC/MS and GC/FTIR. **MS (EI, 70eV): *m/z* (%):** 210 (M⁺, 1), 192 (5), 163 (1), 149 (3), 135 (8), 121 (15), 111 (13), 110 (13), 98 (26), 95 (22), 81(42), 69 (43), 67(49), 55(100), 54(25), 43(28), 41(69). **IR (ZnSe, *v*_{max}):** 1389, 1411, 1474, 1717, 2737, 2853, 2924, 2959, 3007 cm⁻¹.

2.6 Mating behavior sequence description

The description of male *A. pseudochrysoorrea* mating behavior sequence were based on observations performed under laboratory conditions at 25 °C. Virgin males and females of at least 21 days old were placed in plastic boxes 7.5 cm x 3 cm covered with moist filter paper and with a maggot of *Sarconesia chlorogaster* as food source.

2.7 Bioassays

Assays were performed with virgin insects of at least 21 days old, which were separated by sex immediately after adult emergency (Pescckhe, 1983).

The influence of chemical odorants present in female/male TGS on male mating behavior was initially assayed by placing freshly killed females/males glued by the pronotum in a bamboo stick with 13 live males, once at time, in plastic boxes (10 x 10 cm) as arena for 1

minute. Then, the same procedure was repeated with another four female cadavers, totalizing five female cadavers. Grasping behavior (when the male exposes its genital and try to copulate with female as demonstrated in Figure 7) was used as the criterion for the beginning of male copulation response sequence.

In the next experiment, female cadavers were rinsed sequentially in two aliquots of hexane for 45 minutes (the volume of solvent used was the necessary to cover the whole body of the insect) for complete removal of TGS compounds, then the female cadavers were presented to males. Rinsed female cadavers which did not stimulate male grasping were used in the next treatments. Rinsed female cadaver was reconstituted with different volumes of the female TGS extracts (1 μL , 5 μL , 10 μL , 15 μL , 20 μL , 25 μL and 30 μL). In each volume used, five female cadavers were reconstituted and introduced to 13 live males sequentially in the arena, one male each time, and waiting 1min after one male to another. Each volume was prepared from an extract of one female tergal gland in 100 μL of hexane.

The influence of male TGS on male behavior was assayed as described above. Five rinsed male cadavers were reconstituted with four different volumes of male TGS extracts (5 μL , 10 μL , 15 μL and 20 μL) and sequentially introduced to nine live males.

Bioassays were also performed with synthetic compounds for all identified compounds (except 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone) using the same methodology as described above. The concentration of synthetic compounds used was based in the concentration of each compound in 15 μL of the volume solutions (one female tergal gland in 100 μL), because this volume had the best score in initiate male copulatory responses.

2.8 Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the software BioEstat 5.3. The Chi-square was used to test significant differences between all bioassays. Differences in mean quantities between males and females of the identified compounds in ten extracts were tested by Shapiro-Wilk normality test, followed by T-test or Mann-Whitney (Wilcoxon rank-sum test). An experiment-wise error response of 0.05 was considered for all statistical analyses.

3. RESULTS

3.1 Chemical analysis of tergal gland secretion

Eleven compounds which always appears in the GC/MS analysis of the TGS of *A. pseudochrysorrhoea* males and females (Fig. 2) were identified, based on their GC/MS and GC-FTIR spectra, retention indexes and derivatization products (GC/MS and GC-FTIR spectra figures are in appendix). Four compounds were identified as straight chain alkanes: decane (**1**), undecane (**4**), dodecane (**6**) and tridecane (**9**).

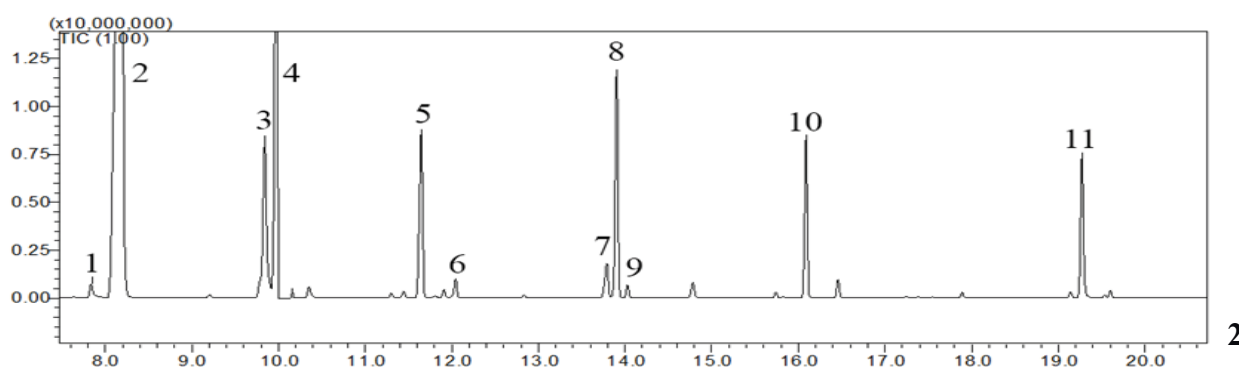


Figure 2. Gas chromatogram of the tergal gland secretion showing the eleven identified compounds. Equipment conditions: DB-5, 50 °C - 270°C at 7 °C min⁻¹.

Compounds **3**, **7** and **8** showed spectral data related to straight chain alkenes, containing one C-C double bond (Fig. 3). MS spectrum for compound **3** (RI: 1096) showed a molecular ion at m/z 154Da, suggesting an undecene carbon chain. Similarly, compounds **7** (RI: 1291) and **8** (RI: 1296) might be related to tridecene chains. FTIR spectra obtained from these compounds showed characteristic bands of a hydrocarbon: aliphatic methylene and methyl axial deformations (ν) at 2850-2957 cm⁻¹ and angular deformation of aliphatic methin protons (ν) at 1452-1459 cm⁻¹. At 2997-3006 cm⁻¹ a characteristic band of the C-H axial deformation of *Z* alkenes was clearly detectable on spectra from all three compounds (Vidal *et al.*, 2016).

The double bond position of compounds **3**, **7** and **8** was determined by derivatization of the natural extract with dimethyldisulfide. GC/MS analysis of the resulting adducts showed relatively strong fragments that allowed the location of the C-C double bond on the parental alkenes. Adduct from **3**, showed the fragments at m/z 103 and 145Da, which allowed the determination of the C-C double bond on the parental alkene at C4-C5, resulting in the assignment of (*Z*)-undec-4-ene as the natural compound (Fig. 3). Following the same principle, (*Z*)-tridec-4-ene and (*Z*)-tridec-6-ene were suggested as the structures for compounds **7** and **8** respectively.

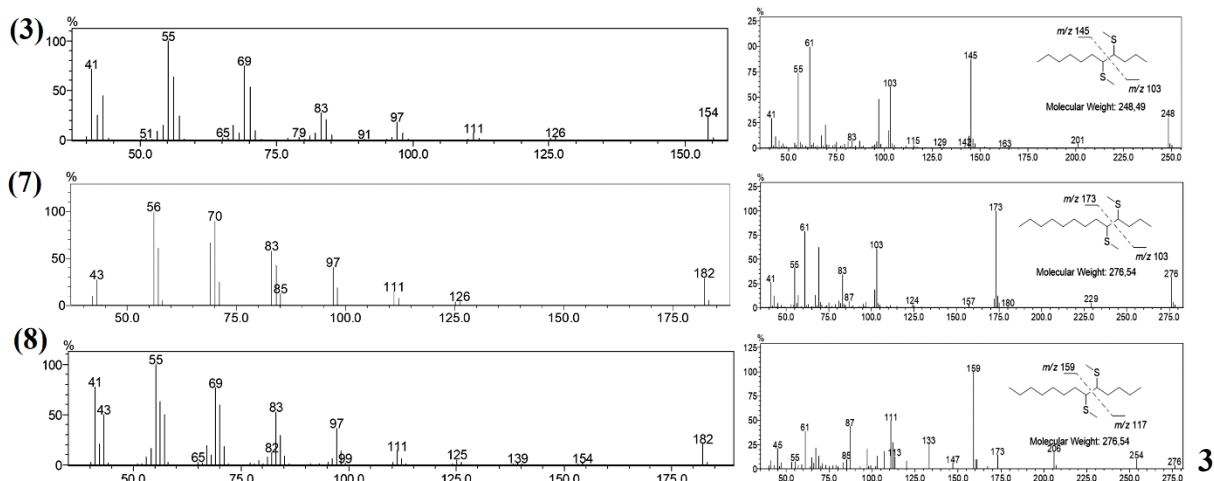


Figure 3. Comparative fragment pattern of the compound **3**, **7** and **8** of the extract with its following DMDS derivatives.

Compounds **3**, **7** and **8** were synthesized in 76, 77, and 74% yield respectively, based on Wittig reactions, starting from the phosphonium salts from 1-bromobutane or 1-bromohexane and the aldehydes heptanal or nonanal, as illustrated on Scheme 1 of the figure 4. As expected, the Wittig reactions resulted in a mixture of *E* and *Z* isomers in a ratio close to 3:1, which were separated on silica gel containing AgNO₃ (5%) (Fig. 4).

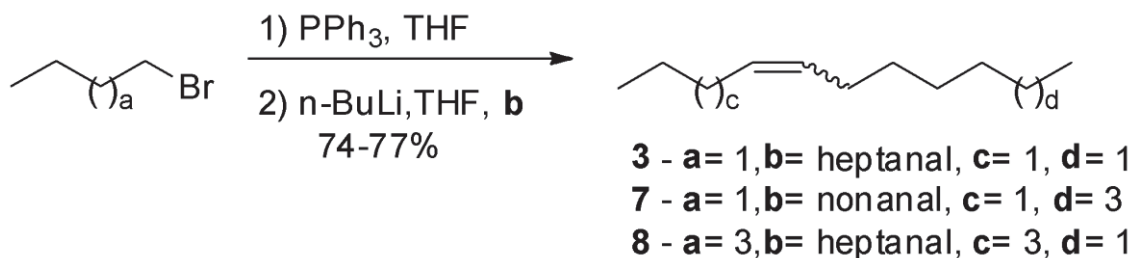


Figure 4. Scheme showing the synthesis of alkenes **3**, **7** and **8**.

Compounds **2** and **5** showed MS and FTIR spectra related to quinones (Figure 9 and 12 of the appendice). Compound **2** (RI: 1014), the major component found in TGS extracts, showed a highly intense molecular ion at *m/z* 122Da, a base peak at *m/z* 94Da besides relatively intense fragments at *m/z* 40, 54, 66 and 84Da. FTIR spectrum for this compound showed an intense band at 1654 cm⁻¹, characteristic for C=O stretch. Three characteristic bands of the C-H axial deformation of trisubstituted alkenes (Xu *et al.*, 2012) or α,β -unsaturated keto (Silverstein *et al.*, 2014) were observed at 3039, 3058 and 3075 cm⁻¹. The spectral data suggested the identity of compound **2** as the quinone 2-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione. MS spectrum from compound **5** (RI: 1181) showed a molecular ion/base peak at *m/z* 152Da and relatively intense fragments at *m/z* 53, 66, 109 and 122Da, suggesting also a quinone structure.

FTIR spectrum showed two intense C=O stretching bands at 1653 and 1671 cm^{-1} , besides two bands related to the C-H axial deformation of alkenes at 3013 and 3066 cm^{-1} and a C-O stretching band from an aromatic ether. The spectral data suggested compound **5** as 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone (Peschke & Metzler, 1982; Kirkemo & White, 1985), a compound usually found in TGS of Aleocharinae species.

The remaining compounds showed spectra characteristic to straight chain aldehydes. Compound **10** (RI: 1410) was readily identified as dodecanal, while compound **11** (RI: 1594) showed spectral data related to an unsaturated chain. MS spectrum suggested a tetradecenal structure, with M^+-18 at m/z 192Da (loss of water), while FTIR spectrum suggested the double bond as *Z*, due to the presence of the band of C-H axial deformation at 2999 cm^{-1} . The double bond position was determined to be between C9 and C10, similarly as the procedure described earlier on this manuscript in the case of the alkenes. Based on this information, the compound **11** was identified as (*Z*)-tetradec-9-enal. Quantification of natural compounds of TGS extracts of males and females demonstrated differences in concentrations between sexes. Female extracts present higher concentration of all compounds in comparison to male extracts. Any other statistical difference is found in Table I.

Compounds	Male	Female	Mann-Whitney	Test T
	Medium (ng)/ SDM	Média (ng)/ SDM		
1) Decane	31,62 ± 4,504	65,87 ± 19,87		ns
2) 2-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione	4151,05 ± 399,6	4834,54 ± 367,9		ns
3) (<i>Z</i>) Undec-4-ene	182,19 ± 35,71	305,96 ± 62,24		ns
4) Undecane	2538,54 ± 404,7	2906,04 ± 437,4	ns	
5) 2-methoxy-3-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione	584,19 ± 84,9	1070,27 ± 205		s
6) Dodecane	37,86 ± 9,931	48,91 ± 11,65	ns	
7) (<i>Z</i>) tridec-4-ene	80,28 ± 15,8	85,66 ± 17,56		ns
8) (<i>Z</i>) tridec-6-ene	325,66 ± 51,15	562,27 ± 117,3		ns
9) Tridecane	19,75 ± 4,013	32,12 ± 9,272	ns	
10) Dodecanal	353,49 ± 55,33	560,59 ± 122,9		ns
11) (<i>Z</i>) Tetradec-9-enal	98,06 ± 42,04	132,84 ± 46,63		ns
Total	8416,55 ± 971,3	11984,23 ± 1192		ns

Table I. Quantification and statistic results of concentration from each identified compounds in TGS from males and females in nanogram per insect, based in 10 extracts. SDM, standard deviation from median; ns, not significant.

3.2 Male grasping response in different concentration of TGS

Fresh freeze killed females with the TGS content intact had the higher copulation response of males (89% of positive response) (N=58). The amount of 1 μ L of the female TGS stimulated copulation response in 20% of males assayed (N=13). Copulation response was observed in 32% of males that were presented to rinsed female cadavers reconstituted with 5 μ L of the TGS extract (N=13). Copulation attempt of 33% was observed when males were assayed with the amount of 10 μ L of female TGS extract (N=22). Increasing the amount to 15 μ L of female TGS extract, the number of males that presented copulation behavior response increased to 84% (N=55). When males were assayed to the amount of 20 μ L of female TGS extract, a decreasing in males copulation activity was observed (49% of positive response) (N=32). When males were presented to rinsed female cadavers treated with 25 μ L of female TGS extract, 58% of males attempted copulation (N=38). A significant decrease in male copulation attempts was observed when 30 μ L of the TGS extract were used to reconstitute rinsed female cadavers (30% of positive response) (N=20) (Fig. 5). The global Chi-square test with all the amounts used showed a statistical difference between the stimulus $\chi^2 = 120.979$ d.f.= 7 $p < 0.0001$. Pairwise test showed a statistical difference between the stimulus fresh freeze killed female and the volumes of 1 μ L ($\chi^2 = 62.843$ d.f.= 1 $p < 0.0001$), 5 μ L ($\chi^2 = 42.538$ d.f.= 1 $p < 0.0001$), 10 μ L ($\chi^2 = 39.526$ d.f.= 1 $p < 0.0001$), 20 μ L ($\chi^2 = 22.226$ d.f.= 1 $p < 0.0001$), 25 μ L ($\chi^2 = 14.114$ d.f.= 1 $p = 0.0002$), 30 μ L ($\chi^2 = 43.609$ d.f.= 1 $p < 0.0001$). Statistical differences were not observed when fresh freeze killed females and the volume of 15 μ L of female TGS extract were compared ($\chi^2 = 0.258$ d.f.= 1 $p = 0.061$). Additional statistical differences between different volumes of female TGS are shown in Figure 5.

Male grasping response to female tergal gland secretion volumes

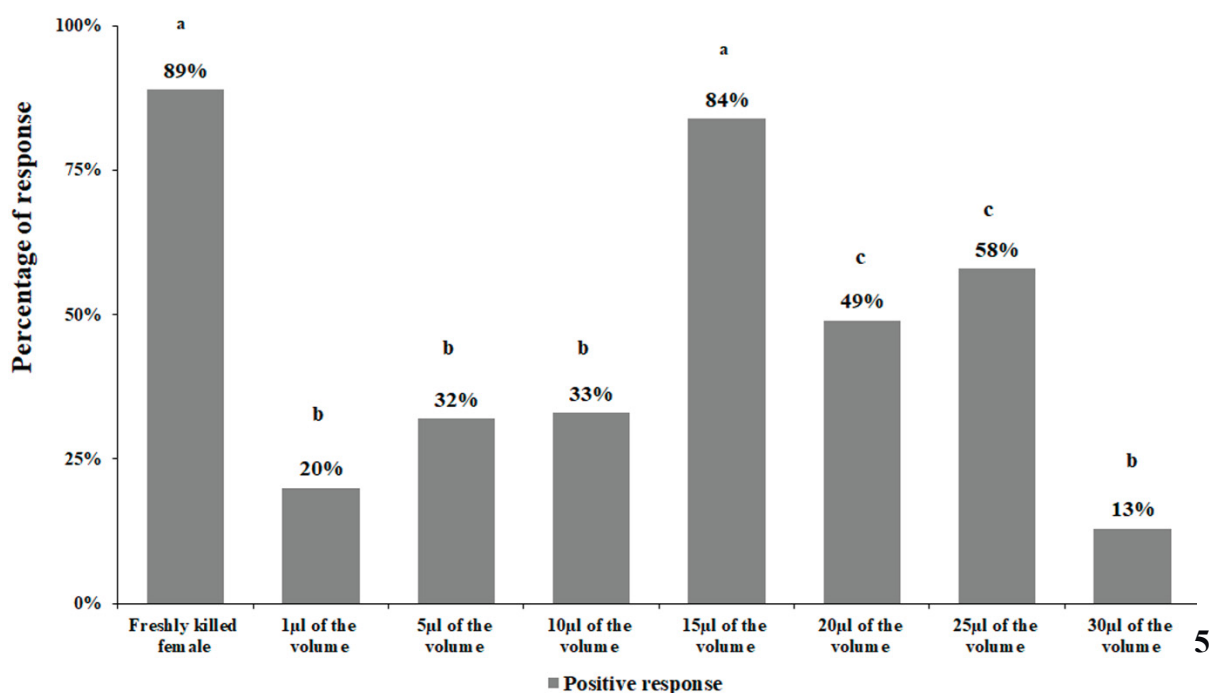


Figure 5. Graphics showing the differences between the stimuli of fresh freeze killed female and the volumes of female tergal gland secretion used to stimulate male copulation. Different letters indicate statistical differences at $p < 0.05$ in the Chi-square test.

The male TGS also stimulated male copulation behavior response in this species, the number of positive responses was smaller in comparison to female TGS (Fig. 6). The volume of 5 µL of male TGS extract elicited only 13% of copulation attempts (N=6). Copulation response was observed in 28% of males that were assayed to the volume of 10 µL of male TGS extract (N=10). The highest percentage of copulation response was obtained when males were assayed to the volume of 15 µL of male TGS (46% of positive responses) (N=21). Copulation response of 15% was observed when males were assayed to the volume of 20 µL of male TGS (N=7). The global Chi-square test with all the bioassays showed that there is a statistical difference between the volumes used $\chi^2 = 17.086$ d.f.= 3 $p < 0.0007$. Pairwise test showed a statistical difference between the volume of 15 µL and 5 µL ($\chi^2 = 11.905$ d.f.= 1 $p < 0.0007$), 15 µL and 10 µL ($\chi^2 = 5.954$ d.f.= 1 $p < 0.01$) and 15 µL and 20 µL ($\chi^2 = 10.161$ d.f.= 1 $p < 0.001$). Other statistical differences between different between of male TGS extract are shown in Figure 6. Synthetic compounds identified in female TGS did not stimulate any male copulation behavior response in bioassays.

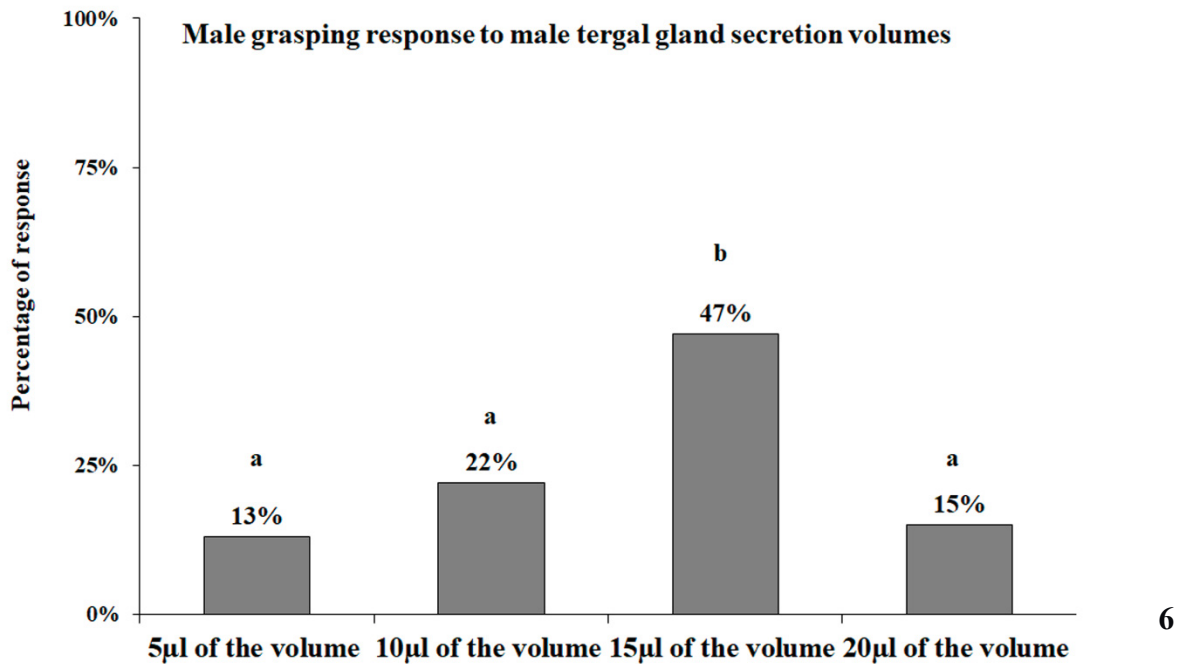


Figure 6. Graphic showing the differences of male copulation behavior response to different volumes of the male tergal gland secretion extract. Different letters indicate statistical differences at $p < 0.05$ in the Chi-square test.

3.3 Mating behavior sequence

Aleochara pseudochrysorrhoea has a mating behavior sequence exhibited by males without elaborated courtship. After a male recognize a female, the male walks toward the female displaying fast antennal movements. When the male gets close to the female, he exposes the parameres at the end of abdomen folded over his head, behavior known as grasping. Then, the male moves to the posterior part of the female body and fixes the parameres in the final portion of the female abdomen. The male remains in this position, with his head under the last segments of female abdominal segments and his abdomen folded over his head and fixes to final portion on female abdomen (Fig. 7).

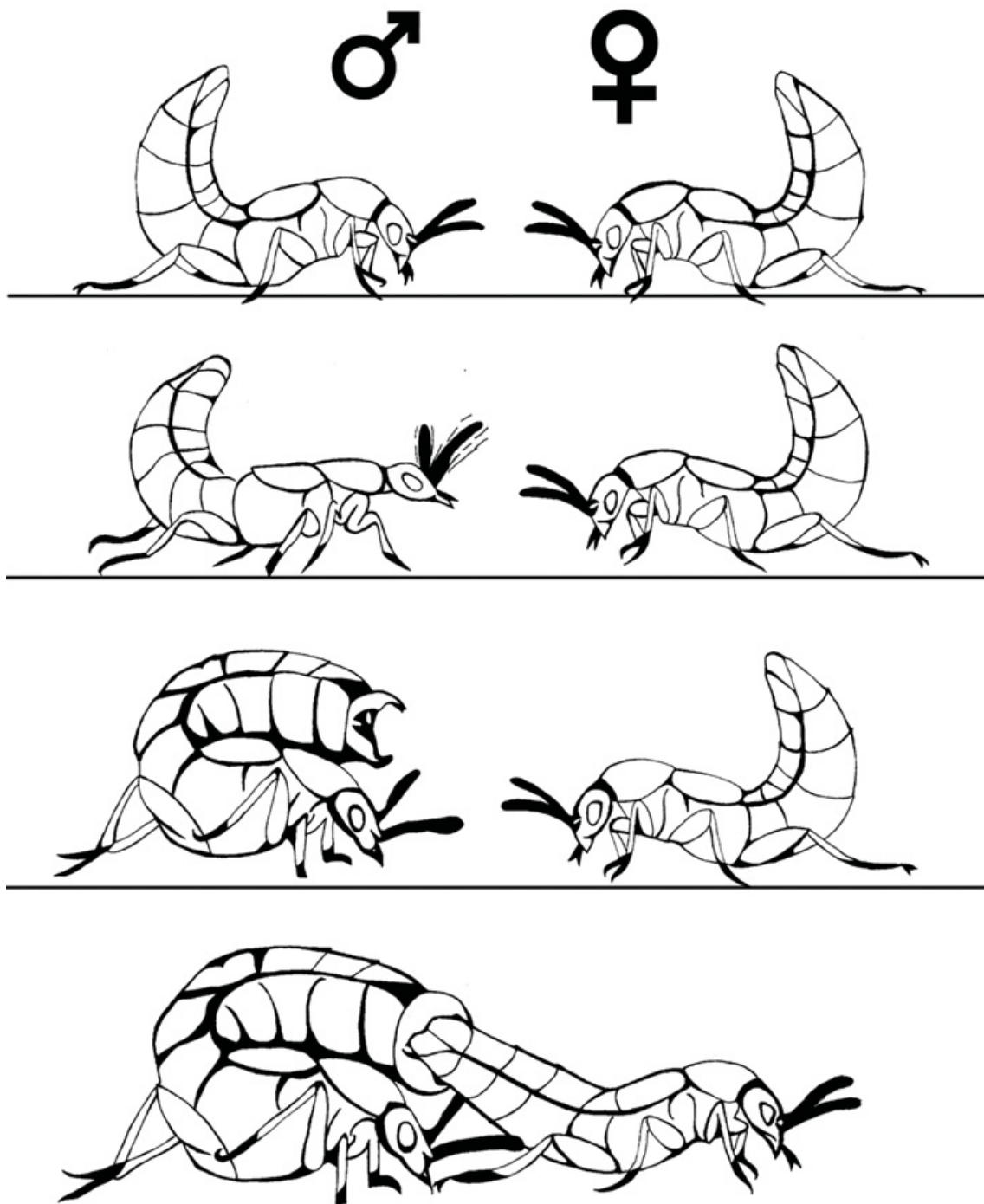


Figure 7. Mating behavior sequence of *Aleochara pseudochysorroa*. Adapted from Peschke (1987).

4. Discussion

The large family of rove beetles, Staphylinidae, comprises about 58,000 species (Bouchar *et al.*, 2011; Solodovnikov *et al.*, 2013). Abdominal defensive glands have independently arisen in many groups (Araujo, 1978).

The possible reason for this evolution pattern is the fact that rove beetles have a usually soft unsclerotized abdomen, which is completely unprotected from predators attack (Francke & Dettner, 2005). This variation occurs not only in the position of the glandular system (e.g. in Aleocharinae, the tergal gland is located between sixth and seventh abdominal segments, while in Staphylininae, the pygidial gland is located in the apex of the abdomen), but also on the type of defensive secretion that is produced and released (Bellás *et al.*, 1971; Pesckhe, 1982). For example, species from the subfamilies Omaliinae and Proteininae release a defensive secretion that comprises a mixture of carboxylic acids (e.g. 2-methylpropanoic acid), while Oxytelinae and Aleocharinae species release compounds with structures related to p-toluquinone. In Steninae, the secretion contains isopiperitenole and a unique spreading alkaloid called stenusine (N-ethyl-3-(2-methylbutyl)piperidine). In Staphylininae, the chemistry varies considerably between species, including terpenoids, acetates, alcohols and ketones (Francke & Dettner, 2005).

Both sexes of *A. pseudochrysorrhoea* present a tergal gland, like other Aleocharinae species, however no sex-specific compounds were identified. When beetles are disturbed, they bend their abdomen over their head and release the secretion from the tergal gland, exactly how other Aleocharinae species do (Steidle & Dettner, 1993).

Chemical analysis of the tergal gland secretion of *A. pseudochrysorrhoea* is very similar to the chemical composition of the TGS of other Aleocharinae species, which comprises saturated and unsaturated linear hydrocarbons, aldehydes and quinones. It has been reported that this secretion has a defensive function (Blum *et al.*, 1971; Brand *et al.*, 1973; Gnanasuderam *et al.*, 1981; Pesckhe & Metzler, 1982; Steidle & Dettner, 1993), however it has been also reported to act as a regulator of intrasexual behavior in some species, which is used to repel subordinate males from the mating site (Pesckhe *et al.*, 1996).

The major compound found in the TGS of *A. pseudochrysorrhoea* is 2-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione (**compound 2**), which has been previously reported as the most abundant compound in the TGS of other 19 out of 26 Aleocharinae species that had the TGS chemical composition investigated (Cap.I Par.1). This compound seems to be very primitive since it occurs in many other Arthropods groups, like as a component produced by scent glands of

opiliones (Caetano & Machado, 2013; El Sayed, 2016). In Staphylinidae, 2-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione is also found in species of the subfamily Oxytelinae, but not as the major compound of gland secretions (Dettner, 1982 and 1985; Steidle, 1995). Due to its strong repellent effect, it has been proposed a defensive function to this compound (Blum *et al.*, 1971; Brand *et al.*, 1973; Gnanasuderam *et al.*, 1981; Peschke & Metzler, 1982; Peschke, 1983; Steidle & Dettner, 1993) but there are reports of it acting as a potent bactericide and fungicide (Dettner, 1987).

The second most abundant compound found in *Aleochara pseudochrysorrhoea* TGS is undecane (**compound 4**). This compound was described in 12 out of 26 Aleocharinae species that had the TGS composition analyzed (Cap.I Par.1). This class of compounds is usually found blended with quinones in defensive secretions, mainly acting as a solvent to enhance impregnation of defensive compounds (Eisner & Meinwald, 1966; Schildknecht, 1968; Weatherston & Percy, 1970; Pesckke & Metzler, 1982).

The aldehydes found in *A.pseudochrysorrhoea* TGS are very similar to those found in the TGS content of *A. curtula*, *Atheta crassicornis* Fabricius, *Drusilla canaliculata* Fabricius, *Oxypoda alternans* Gravenhorst, *Pella funestus* Gravenhorst, *Pella humeralis* Gravenhorst, *Zyras lugens* Gravenhorst, and *Zyras funestus* Gravenhorst (Brand, 1973; Peschke & Metzler, 1982; Steidle, 1993; Stoeffler, 2007). This class of compounds is related to self-defense and protection against bacteria and fungi, but it is also related to stimulation of male mating behavior sequence (Peschke, 1983; Dettner, 1987).

The chemical content of Aleocharinae species TGS have been reported to have a defensive function (Jordan, 1913). During his experiments, Jordan (1913) observed that ants instantly died after being confined in a tube containing TGS of *Lomechusa strumosa* Gravenhorst. The minor compounds found in Aleocharinae species TGS have been interpreted as a subsidiary result of biochemical pathways (Dettner, 1980, Pesckhe, 1983), but Kremmer (1923) was the first to propose a secondary function of TGS content. Kremmer (1923) observed also that Aleocharinae individuals emitted a pungent odor when confined and male mating behavior sequence was also observed. In 1983, Peschke was the first to demonstrate conclusively a secondary function for the TGS of *Aleochara curtula*. TGS of female *A. curtula* also acts as an aphrodisiac, stimulating male copulation activity.

The chemical compounds present in *A. pseudochrysorrhoea* TGS play an important role in chemical communication of this species. The compounds present in the female TGS of *A. pseudochrysorrhoea* stimulates male copulation response higher than in other species (38% of

male copulation response in *A. curtula*, while 84% of male copulation response in *A. pseudochrysorrhoea*). In these two species, the stimulation of male grasping response reaction by female TGS is dependent on concentration. However, no male copulation response was observed in bioassays using synthetic female compounds of *A. pseudochrysorrhoea* TGS, while the synthetic compound dodecanal identified from *A. curtula* female TGS stimulates 38% of copulation response in *A. curtula* males (Peschke, 1983).

The occurrence of homosexual behavior in *A. pseudochrysorrhoea* is observed when males are kept in groups. Our experiments demonstrated that male TGS stimulates male grasping reaction response. It might be related to intraspecific competition for food source, once Peschke (1986) have demonstrated that old mature males of *A. curtula* do not express homosexual behavior when fed, but young males can accept homosexual copula in order to have access to food sources.

5. Conclusion

Aleochara pseudochrysorrhoea tergal gland secretion is a very complex system to be fully understood, once that the content of this glandular apparatus plays many important functions in this species. As primordial function, TGS content can be used as defense against other inhabitants of animal carcasses or in intraspecific competition. We observed that the tergal gland secretion of *A. pseudochrysorrhoea* has a secondary function in its mate identification and copulation system, which is stimulating male mating sequence behavior.

References

- Blum, M.S. (1971). Chemical Defenses of Arthropods, **Academic Press**, New York.
- Brand, J. M.; Blum, M. S.; Fales, H. M.; Pasteels, J.M. (1973). The chemistry of the defensive secretion of the beetle *Drusilla canaliculata*. **Journal of Insect Physiology**, 19, 369-382.
- Caetano, D. S. & Machado, G. (2013). The ecological tale of Gonyleptidae (Arachnida, Opiliones) evolution: phylogeny of a Neotropical lineage of armoured harvestmen using ecological, behavioural and chemical characters. **Cladistics**, 29, 589-609.
- Caron, E.; Mise, K.M; Klimaszewski, J. (2008). *Aleochara pseudochrysorrhoea*, a new species from southern Brazil (Coleoptera: Staphylinidae: Aleocharinae), with a complete checklist of Neotropical species of the genus. **Revista Brasileira de Zoologia**, 25, 827–842.
- Dettner, K. 1980. Chemotaxonomie der Wasserkiifer (Hydradephaga) und Kurzflügler (Staphylinidae) anhand der aus homologen Drüsen isolierten Abwehrstoffe. **Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft**. 1980:296.
- Dettner, K. & Schwlnger, G. (1982). Defensive secretions of three Oxytelinae rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae). **Journal of Chemical Ecology**, 8, 1411-1420.
- Dettner, K.; Schwinger, G.; Wunderle, P. (1985). Sticky secretion from two pairs of defensive glands of rove beetle *Deleaster dichrous* (Grav.) (Coleoptera: Staphylinidae). **Journal of Chemical Ecology**, 11, 859-883.
- Dettner, K. (1991). Solvent-dependent variability of effectiveness of quinone-defensive systems of Oxytelinae beetles (Coleoptera: Staphylinidae). **Entomologia Generalis**, 15:275-292.
- El-Sayed, A. M. (2018). The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. Disponível em: <<http://www.pherobase.com>>.
- Eisner, T., & Meinwald, J. (1966). Defensive secretions of arthropods. **Science**, 153:1341-1350.
- Francke, W. & Dettner, K. (2005). Chemical Signalling in Beetles. **Topics in Current Chemistry**, 240: 85– 166.
- Gnanasunderam, C.; Butcher, C. F.; Hutchins, R. F. N. (1981). Chemistry of the defensive secretions of some New Zealand rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae). **Insect Biochemical**, 11, 411-416.
- Jordan, K. H. C. (1913). Zur Morphologie und Biologie der myrmecophilen Gattungen *Lomechusa* und *Atemeles* und einiger verwandter. **Formenwiss**, 107, 346-386.

- Kemner, N.A. (1926). Zur Kenntnis der Staphyliniden-Larven. II Die Lebensweise und die parasitische Entwicklung der echten Aleochariden. **Entomologisk Tidskrift**, 47:133-170.
- Kirkemo, C. L. & White, J. D. (1985). Synthesis of methyl 3,5,9,11,13-pentaoxotetradecanoate, a "skipped" heptaketide, via ozonolysis of a hydroaromatic system. **Journal of Organic Chemistry**, 50, 1316.
- Klimaszewski, J. (1984). A revision of the genus *Aleochara* Gravenhorst of America North of Mexico (Coleoptera: Staphylinidae: Aleocharinae). **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, 129, 1–211.
- Klimaszewski, J. & Jansen, R.E. (1993) Systematics, biology and distribution of *Aleochara* Gravenhorst from Southern Africa. Part I: subgenus *Xenochara* Mulsant & Rey (Coleoptera: Staphylinidae). **Annals of the Transvaal Museum**, 36, 53–107.
- Maus, C.; Mittmann, B.; Peschke, K. (1998). Host records of Parasitoid *Aleochara* Gravenhorst species (Coleoptera: Staphylinidae) attacking cyclorrhaphous Diptera. **Deutsche Entomologische Zeitschrift**, 45, 231–254.
- Mise, K.M.; Almeida, L.M.; Moura, M.O. (2007). Levantamento da fauna de Coleoptera que habita a carcaça de *Sus scrofa* L., em Curitiba, Paraná. **Revista Brasileira de Entomologia**, 51, 358–368.
- Navarrete-Heredia, J. L.; Newton, A. F.; Thayer, M. K.; Ashe, J.S.; Chandler, D.S. (2002). Guía ilustrada de los géneros de Staphylinidae (Coleoptera) de México - Illustrated Guide to the Genera of Staphylinidae (Coleoptera) of Mexico. **Universidad de Guadalajara y CONABIO**, México, D.F., pp. xii + 401.
- Pasteels, J. (1968). Le système glandulaire tégumentaire des Aleocharinae (Coleoptera, Staphylinidae) et son évolution chez les espèces termitophiles du genre *Termitella*. **Arch Biol**, 79, 381–446.
- Peschke, K. & Fuldner, D. (1977). Übersicht und neue Untersuchungen zur Lebensweise der parasitoiden Aleocharinae (Coleoptera: Staphylinidae). **Zoologische Jahrbucher: Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere**, 104, 242–262.
- Peschke, K. (1978). The female sex pheromone of the staphylinidae beetle, *Aleochara curtula*. **Journal of Insect Physiology**, 24, 197-200.
- Peschke, K. & Metzler, M. (1982). Defensive and pheromonal secretion of the tergal gland of *Aleochara curtula*. I. The chemical composition. **Journal of Chemical Ecology**, 8, 773-783.

- Peschke, K. (1983). Defensive and pheromonal secretion of the tergal gland of *Aleochara curtula* II. Release and inhibition of male copulatory behavior. **Journal of Chemical Ecology**, 9, 13-31.
- Peschke, K. & Metzler, M. (1987). Cuticular hydrocarbons and female sex pheromones of the rove beetle, *Aleochara curtula* (Goeze) (Coleoptera: Staphylinidae). **Insect Biochemical**, 17, 167-178.
- Peschke, K. (1987). Male aggression, female mimicry and female choice in the rove beetle, *Aleochara curtula* (Coleoptera, Staphylinidae). **Ethology**, 75:265-284.
- Peschke, K. & Eisner, T. (1987). Defensive secretion of the tenebrionid beetle, *Blaps mucronata*: physical and chemical determinants of effectiveness. **Journal of Comparison Physiology**, 161, 377-388.
- Peschke, K.; Friedrich, P.; Gantert, C.; Metzler, M. (1996). The use of the tergal gland defensive secretion in male intrasexual aggression of the rove beetle, *Aleochara curtula* (Coleoptera: Staphylinidae), measured by closed-loop-stripping analyses and tandem bioassay – mass fragmentography. **Chemoecology**, 7:24–33
- Peschke, K.; Friedrich, P.; Kaiser, U.; Franke, S.; Francke, W. (1999). Isopropyl (Z9)-hexadecenoate as a male attractant pheromone from the sternal gland of the rove beetle *Aleochara curtula* (Coleoptera: Staphylinidae). **Chemoecology**, 9, 47-54.
- Schildknecht, H.; Maschwitz, U.; Winkler, H. (1968). Zur Evolution der Carabiden Wehrdrüsensekrete. Arthropoden-Abwehrstoffe XXXII. **Naturwissenschaften**, 55,112-117.
- Silva, M. R. & Zarbin, P. H. G. (2016). First description of larval stages of *Aleochara pseudochrysoorrhoea* Caron, Mise & Klimaszewski, 2008. **Zootaxa**, 4173 (5): 449–465.
- Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J.; Bryce, D. L.; (2014). Spectrometric Identification of Organic Compounds, 8th Edition.
- Souza, A. M. & Linhares, A. X. (1997) Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. **Medical and Veterinary Entomology**, 11, 8–12.
- Steidle, J. L. M. & Dettner, K. (1993). Chemistry and morphology of the tergal gland of freeliving adult Aleocharinae (Coleoptera: Staphylinidae) and its phylogenetic significance. **Systematics Entomology**, 18, 149-168.
- Steidle, J. L. M. & Dettner, K. (1995). The Chemistry of the Abdominal Gland secretion of Six Species of the Rove Beetle Genus *Bledius*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 23, 757-765.

- Stoeffler, M.; Maier, T. S.; Tolasch, T.; Steidle, J. L. M. (2007). Foreign-language skills in rove-Beetles? Evidence for chemical mimicry of ant alarm pheromones in myrmecophilous Pella beetles (Coleoptera: Staphylinidae). **Journal of Chemical Ecology**, 33, 1382-1392.
- Svatoš, A. & Attygalle, A. B. (1997). Characterization of vinyl-substituted, carbon-carbon double bonds by GC/FT-IR analysis. **Analytical Chemistry**, 69, 1827-1836.
- Vidal, D.M.; Fávaro, C. F.; Guimarães, M.M.; Zarbin, P. H. G.; (2016). Identification and Synthesis of the Male-Produced Sex Pheromone of the Soldier Beetle *Chauliognathus fallax* (Coleoptera: Cantharidae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 27 (8), 1506-1511.
- Tabor, K. L.; Fell, R. D.; Brewster, C.C. (2005). Insect fauna visiting carrion in Southwest Virginia. **Forensic Science International**, 150, 73–80.
- Xu, P. ; Garczynski, S. F.; Atungulu, E. ; Syed, Z.; Choo, Y. ; Vidal, D. M. ; Zitelli, C. H. L. ; Leal, W. S. (2012). Moth Sex Pheromone Receptors and Deceitful Parapheromones. **Plos One**, 7, 41653.
- Weatherston, J. & Percy, J. E. (1970). Arthropod defensive secretions, pp. 95-144. In M. Berzosa (ed.). **Chemicals Controlling Insect Behavior**. Academic Press; New York.

Apêndice

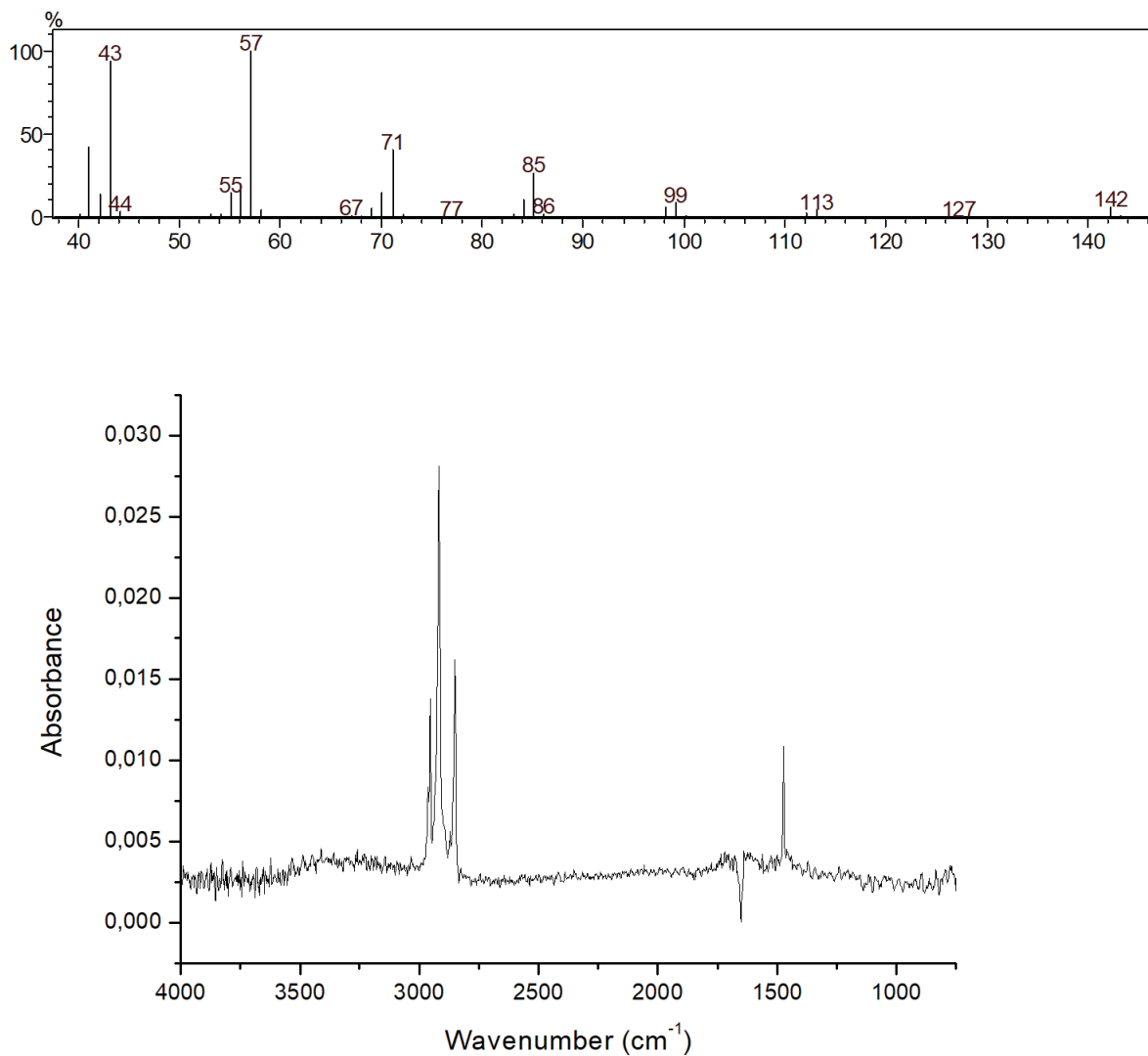


Figure 8. Mass and FTIR spectra of the compound decane (**1**).

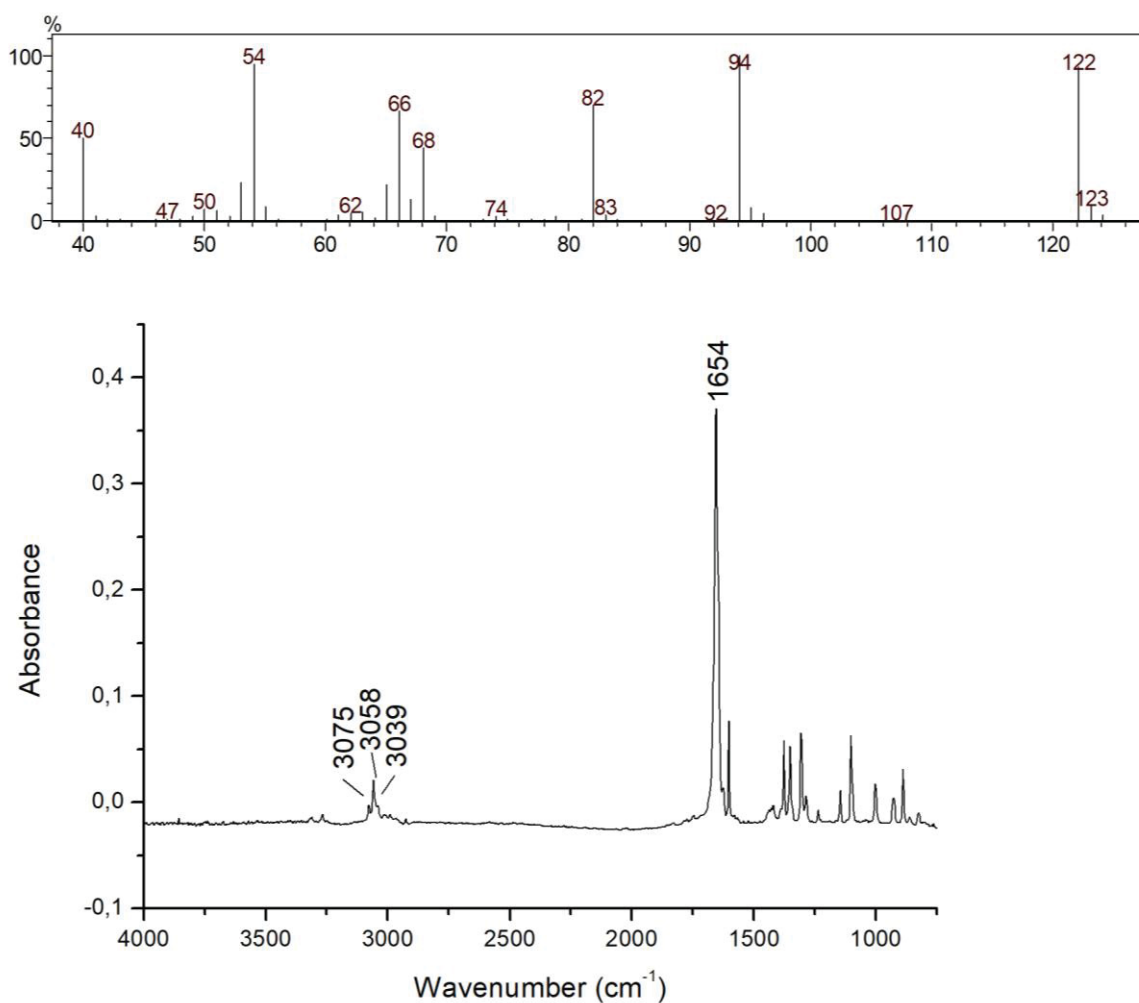


Figure 9. Mass and FTIR spectra of the compound 2-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione (**2**).

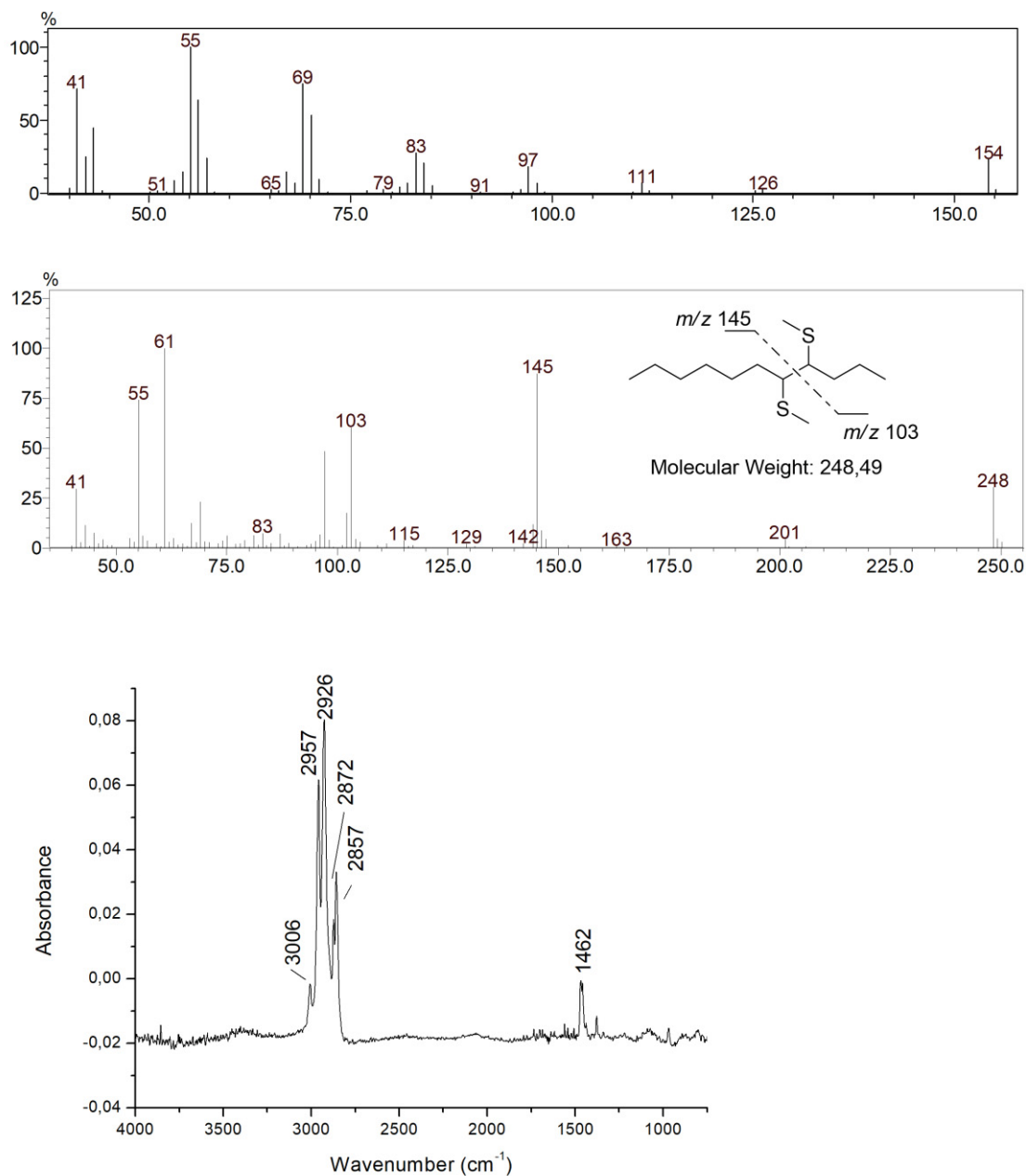


Figure 10. Mass, DMDS fragmentation pattern and FTIR spectra of the compound (Z)-undec-4-ene (3).

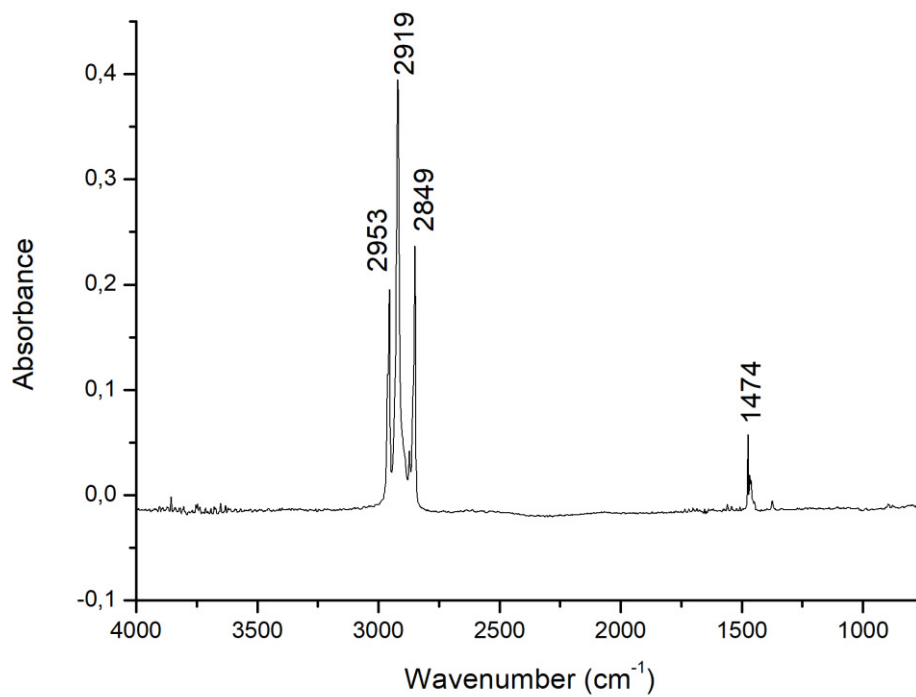
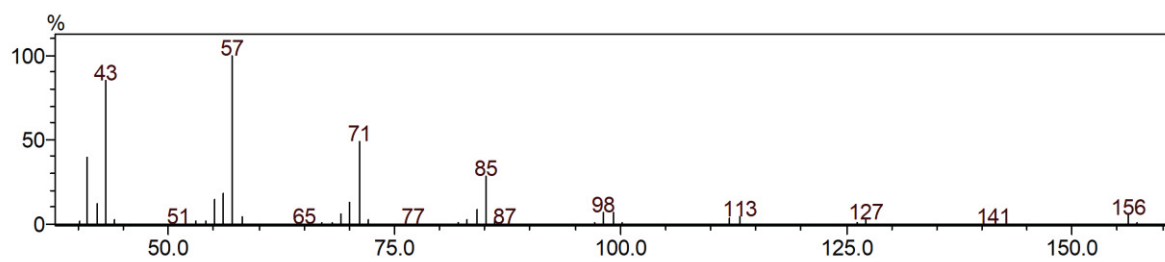


Figure 11. Mass and FTIR spectra of the compound undecane (4).

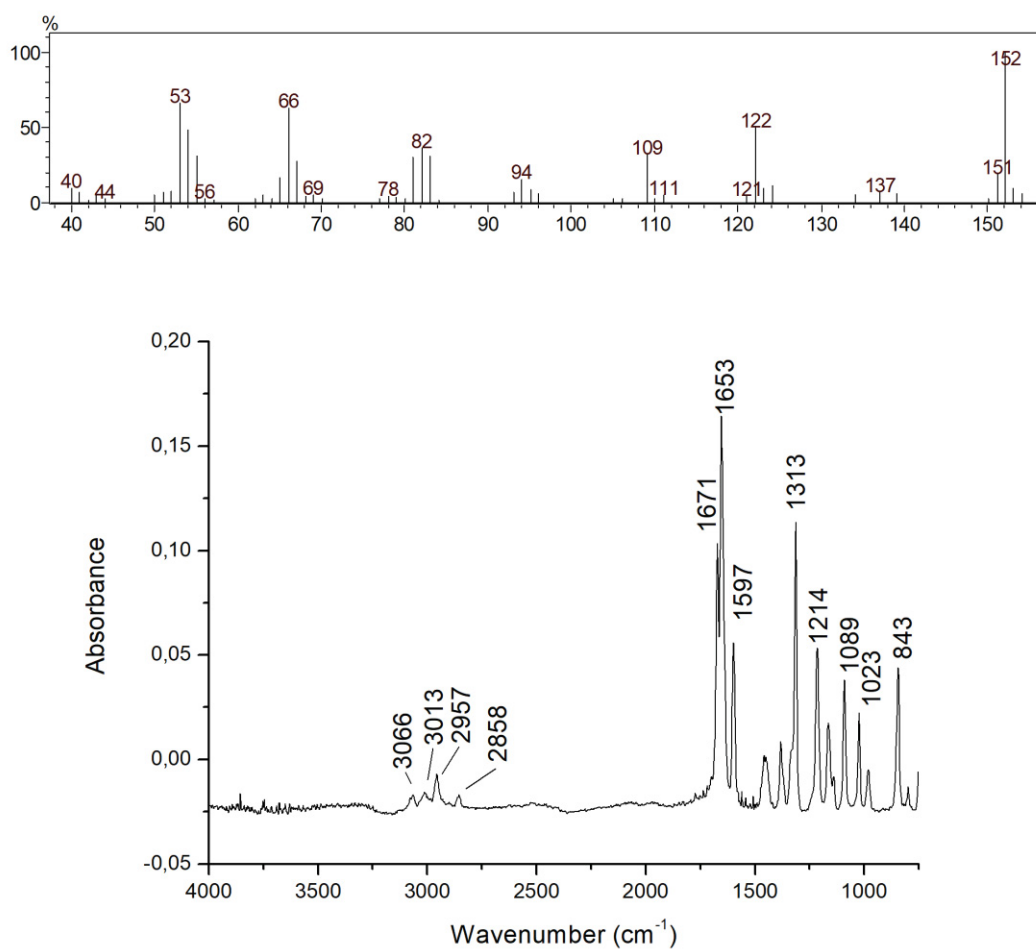


Figure 12. Mass and FTIR spectra of the compound 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone (5).

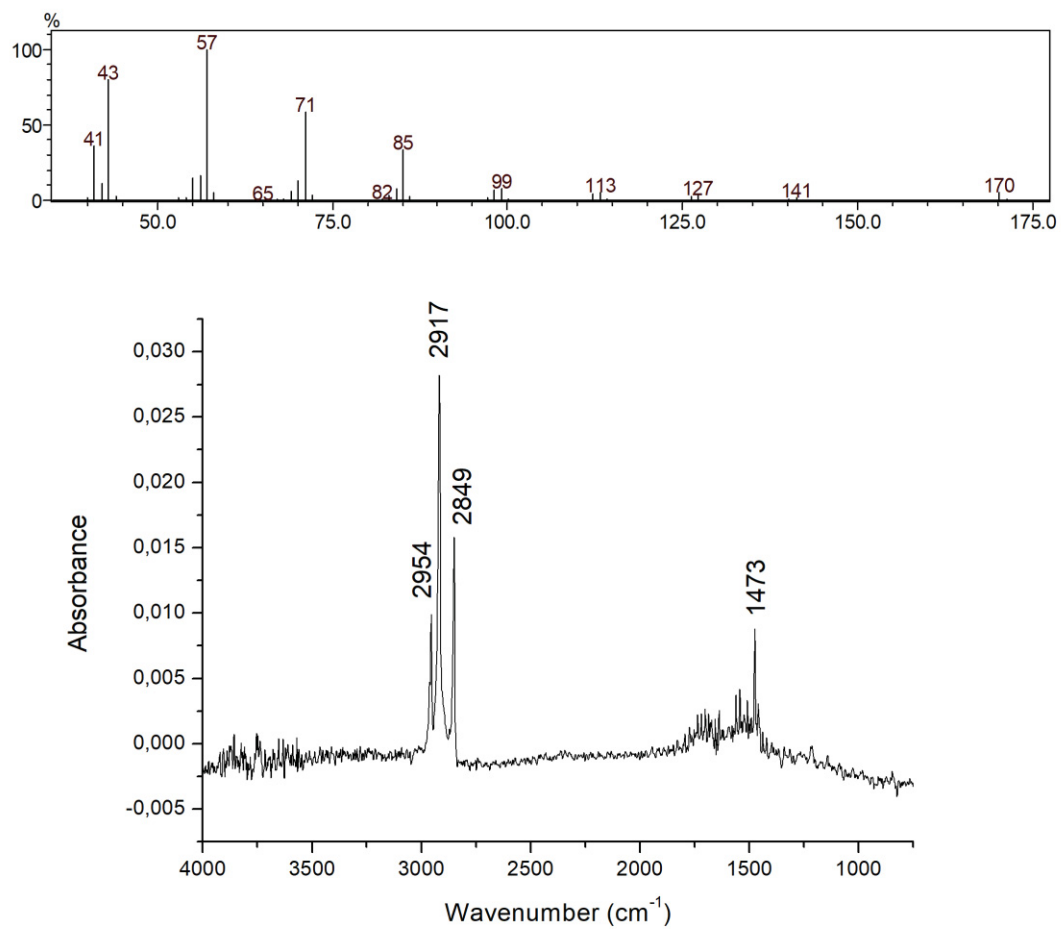


Figure 13. Mass and FTIR spectra of the compound dodecane (6).

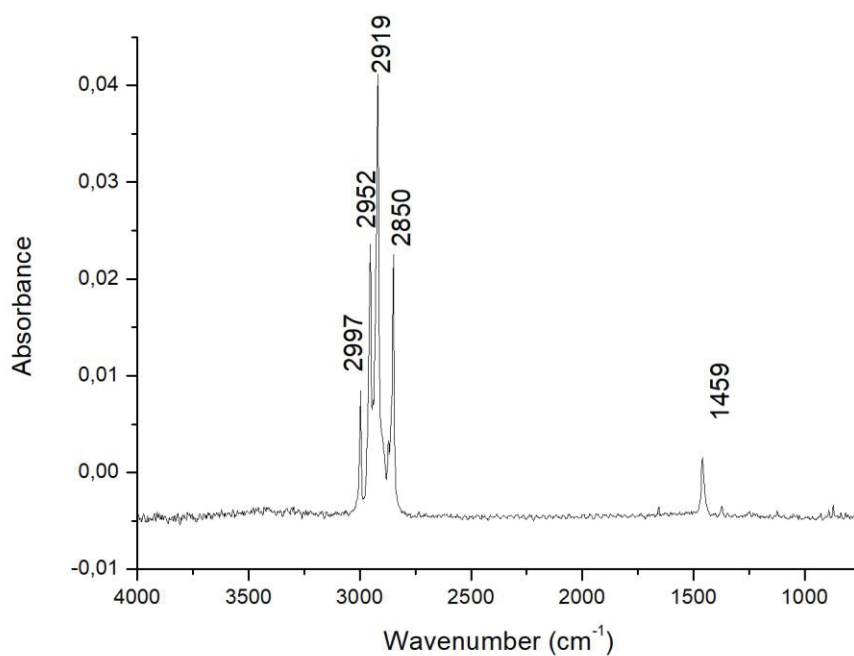
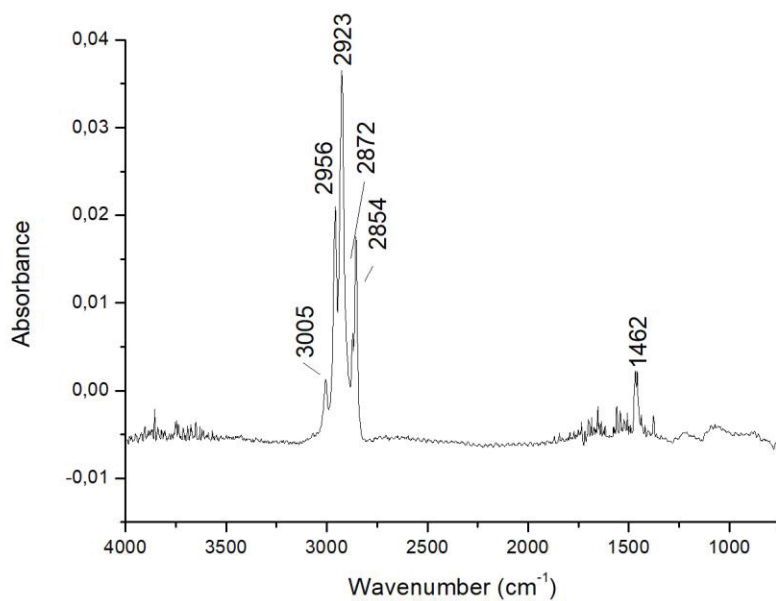


Figure 14. FTIR spectra of the compounds (*Z*)-tridec-4-ene (**7**) and (*Z*)-tridec-6-ene (**8**).

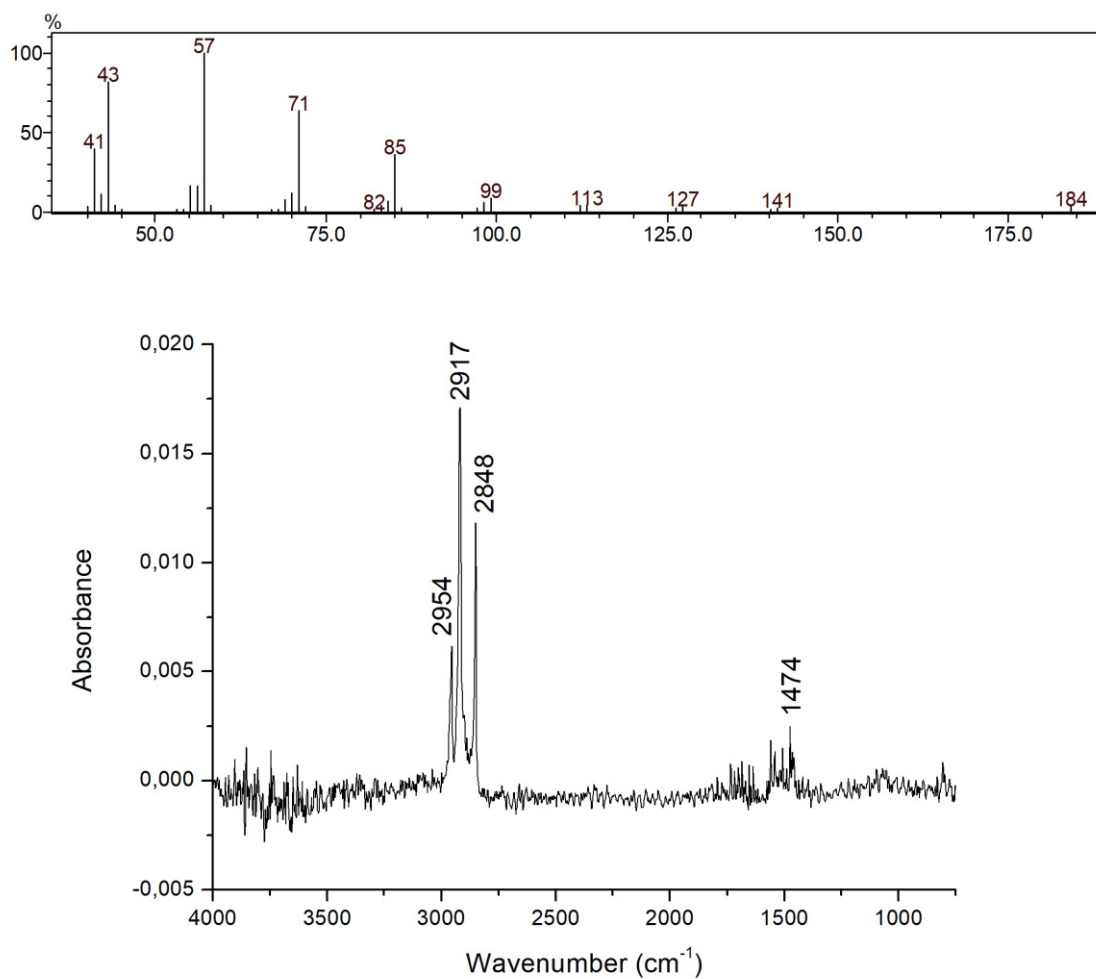


Figure 15. Mass and FTIR spectra of the compound tridecane (9).

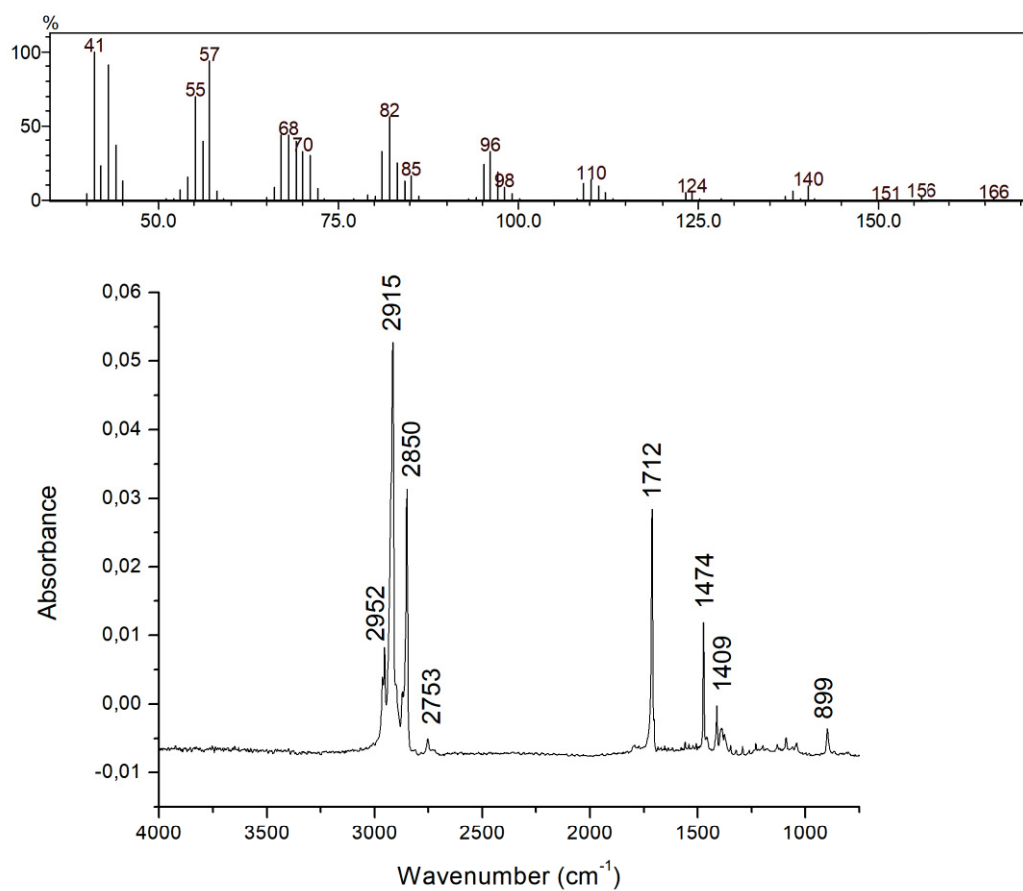


Figure 16. Mass and FTIR spectra of the compound dodecanal (**10**).

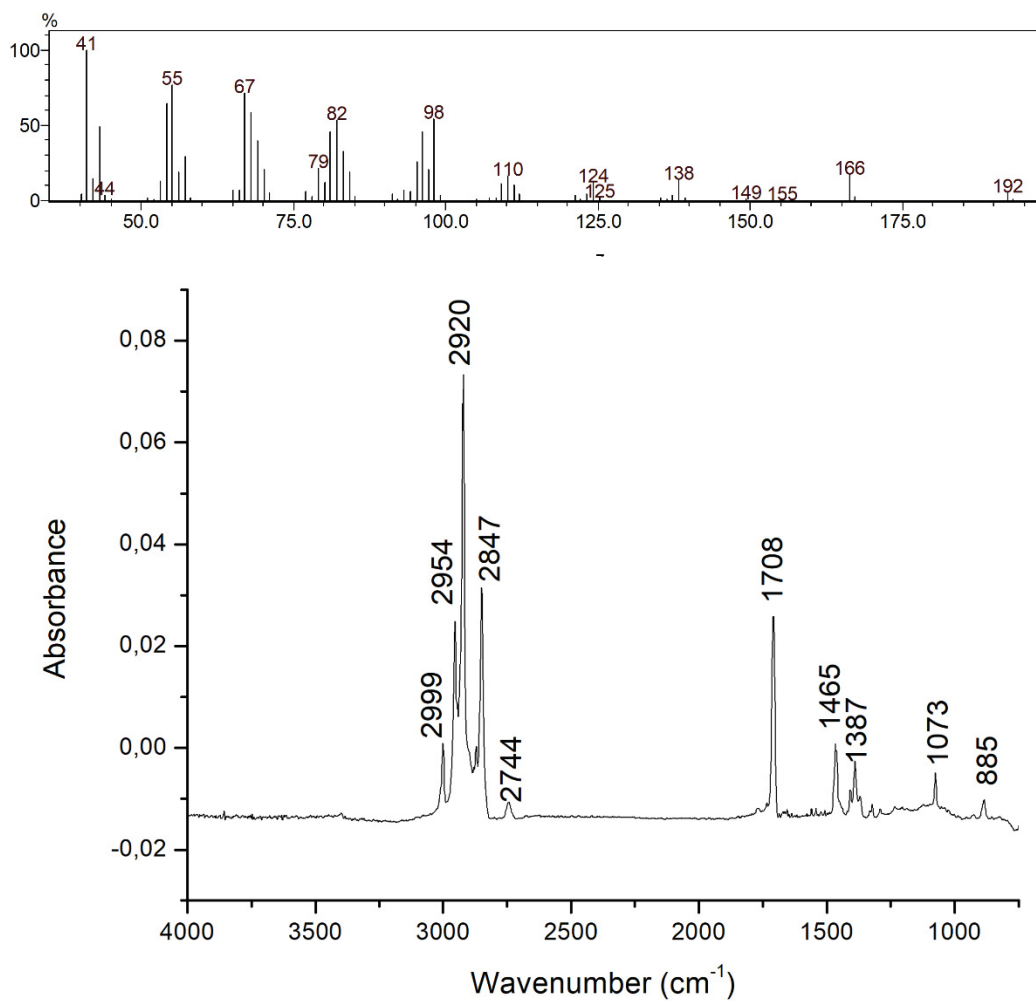


Figure 17. Mass and FTIR spectra of the compound (*Z*)- tetradec-9-enal (**11**).

CAPÍTULO I: PARTE 3

First description of larval stages of *Aleochara pseudochrysorrhoea* Caron, Mise & Klimaszewski, 2008 *

*Este capítulo foi publicado na revista Zootaxa <http://doi.org/10.11646/zootaxa.4173.5.2>

Resumo

Aleochara pseudochryssoroa é uma abundante espécie encontrada no Centro Politécnico na Universidade Federal do Paraná-Curitiba-Paraná-Brasil (UFPR). Esta espécie pode ser facilmente coletada em carcaças de animais, podendo ser considerada um importante predador de moscas na área. Os adultos desta espécie predam larvas na sua fase adulta, enquanto que na sua fase larval são parasitoides de pupas de moscas ciclórrafas. As fases imaturas de *Aleochara pseudochryssoroa* descritas aqui são oriundas de criação partindo de adultos coletados em carcaças de animais no Centro Politécnico (UFPR) em Curitiba, Paraná, Brasil. Os imaturos obtidos foram clareados e estudados em gliceriana e todas as fases foram descritas. Neste estudo, foi descrito e ilustrado pela primeira vez todos os instares larvais de *Aleochara pseudochryssoroa*.

Palavras chave: Staphylinidae, imaturos, primeiro instar, segundo instar, terceiro instar, pupa.

Abstract

Aleochara pseudochryssoroa is an abundant species near Centro Politécnico UFPR (Federal University of Paraná), Curitiba, Paraná, Brazil. This species can be easily collected in animal carcasses being an important fly regulator in this area. The adults of *Aleochara* prey on fly larvae, while the immature stages of *Aleochara* are parasitoids of fly pupae. The larvae studied here, were reared from adults of *A.pseudochryssoroa* collected in Curitiba, Paraná state, Brazil in animal carcasses. The immature specimens obtained were cleared and studied in glycerin in order to describe all immature stages. In this work, we describe and illustrate all larval instars of *Aleochara pseudochryssoroa*.

Keywords: Staphylinidae, immature, first instar, second instar, third instar, pupa.

1. Introduction

Aleochara is a worldwide genus that comprises about 437 species of which around 86 species occur in the Neotropical region (Newton & Thayer 2005, Angélico Asenjo Data Base pers. comm.). *Aleochara* species are known to be parasitoids of cyclorrhaphous dipteran pupae, with larvae and adults found in fly-infested habitats such as animal droppings, carrion and decaying organic matter such as forest litter, mushrooms, fermented fruit and decaying seaweed (Klimaszewski & Jansen 1993; Maus et al., 1998; Caron et al. 2008). The life history of *Aleochara* species is totally dependent on cyclorrhaphous Diptera, as adults prey on eggs, larvae and pupae of dipterous species. *Aleochara* larvae also feed on pupae inside the puparia (Peschke & Fuldner 1977; Klimaszewski 1984; Klimaszewski & Jansen 1993; Maus et al. 1998), established this group as a natural fly regulators and is important for ecological studies (Jonasson 1994), and as forensic indicators (Souza & Linhares 1997; Tabor et al. 2005; Mise et al. 2007). Females of *Aleochara* seek fly infested areas to lay their eggs. After hatching, the first larval instar actively search for fly host puparia (Maus et al. 1998). Once inside the fly puparium, the *Aleochara* larva feeds from the first until the third instar. Then the larvae emerge from the host puparium and pupate in the soil (e.g. *Aleochara pseudochrysorrhoea*), but in some cases the third instar pupates inside the host puparium (Peschke & Fuldner 1977). The genus *Aleochara* is very important and abundant in many microhabitats, but the immature stages of very few species have been described. This problem is due to the large size of the genus *Aleochara* (437 species) and the difficulty in making confident larval-adult-associations (Ashe & Watrous 1984). The aim of this article is to describe the egg, pupa, larva and transition to adults for *Aleochara pseudochrysorrhoea* for the first time, to improve the knowledge of the immature stages of this enormous genus.

2. Material and methods

Adults of *Aleochara pseudochrysorrhoea* were collected in the type locality, Curitiba, Paraná states, Brazil in animal carcass (25°26'44.5"S, 49°13'56.6"W). The examined larvae were obtained from rearing adults collected. Rearing was performed in a climatic chamber at 25°C, with photoperiod of 12 hours at the Departamento de Zoologia da Universidade Federal do

Paraná (UFPR). The adults were fed with first and second larval instar of *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) (Diptera). The immature stages of *A. pseudochryssorroa* were obtained with puparia of *Sarconesia chlorogaster* as hosts for the parasitoid larvae. All larval instars will be deposited together with the type specimens of *Aleochara pseudochryssorroa* at the DZUP (Coleção Entomologica Pe. Jesus Santiago Moure, Curitiba, Paraná, Brazil - Curators: Luciane Marinoni, Dra. Lúcia Massutti Almeida and Cibele S. Ribeiro-Costa).

2.1 Morphology

The morphological terms adopted here follow Ashe & Watrous (1984). The features observed are from cleared specimens and studied in glycerin. The observations were carried out under a Zeiss Discovery V8 stereoscopic microscope. Photographs were taken using a LEICA MZ16 stereoscopic microscope with LEICA DFC 500 camera attached in Taxonline (The Biological Collection Network of Paraná, UFPR) either Scanning Electron Microscope JEOL/EO VERSION 1.1 in the CME (Electron Microscopy Center of Federal University of Paraná). Measurements were made with Zeiss Discovery V8 stereoscopic microscope. The chaetotaxy of the larvae is shown in the images.

3. Results

3.1 Diagnosis

The diagnosis provided here is based only on mature third instar. The last larval instar of *A.pseudochryssorroa* can be distinguished from some other aleocharinae larvae by the following combination of characters: ecdysial suture of head Y-shaped and starting at the antennal cavities, antennae evident, mouthparts evident, mandibles with bifurcate apex, pronotum only with Anterior setae 5, and Dorsal 1 and 2, ventral head with Ventral setae 1 and 2 and by the diminutive urogomphus. The last larval instar of *A.pseudochryssorroa* can be distinguished from *Aleochara bilineata* Gyllenhal (larvae described by Fuldner, 1960) by the head with Y-shaped ecdysial suture starting at antennal cavities (starting at the half of head in *A. bilineata*), antennae evident (diminutive in *A. bilineata*). It can be distinguished from *Aleochara moesta* Gravenhorst (larvae described by Tawfik et al., 1960) by the mouthparts well-developed (much reduced in *A. moesta*). Furthermore, the last larval instar of

A.pseudochryssorrhoea can be distinguished from some other aleocharine larvae belonging to other tribes, as *Dolotia coriaria* (Kraatz) (larvae described by Ashe & Watrous, 1984) by pronotum with only Anterior setae 5 (A1–A5 in *D. coriaria*), Dorsal setae 1 and 2 (D1–D3 in *D. coriaria*) and the size of the urogomphus diminutive in *A. pseudochryssorrhoea* (about 1/3 of size of tergite IX in *D. coriaria*). It can be distinguished from *Diaulota pacifica* Sawada (larvae described by Kim et al., 2000) by the urogomphus evident and separated from the body (fused in *D. pacifica*). It can easily be distinguished from *Hoplandria klimaszewskii* Génier (larvae described by Thayer et al., 2004) by the Y-Shaped ecdysial suture on head (T-shaped in *H. klimaszewskii*). It can be differentiated from *Placusa despecta* Erichson (larvae described by Ashe, 1990) for having mandibles bifurcate at the apex.

3.2 Descriptions

Egg: length: 0.3 mm, width: 0.2 mm. Ellipsoid, milky in color, chorion smooth (Fig. 1).

First instar: length: 1.6–1.7 mm, width: 0.3mm. Diminutive and slender, body overall pale to yellowish, except the head, labrum, mandibles and abdominal segments VIII–X which are dark yellow, and the last antennal segment dark; entire body with many setae distributed as shown in (Figs. 2–4). **Head:** slightly longer than wider, dorsal head with evident Y-shaped ecdysial suture starting at antennal cavities and reaching the base of head posteriorly (Figs. 5–7). One stemma (=ocellus) on each side, close to antennal insertion (Figs. 2–3). Antennae small, 3-segmented; 1° subquadrate; 2° a lobe, three times size of preceding one, with a small sensory appendage on inner side, three setae distributed on the middle; 3° longer than wide, about half size of preceding one, apical part with two setae and two solenidia (Fig. 5). Labrum as an irregular lobe, wider than long and with five anterior seta in dorsal view (Fig. 5). Mandibles as long as half of head, falciform, curved at the middle with two long basal setae at outer margin; apex bifurcate, the apical part slightly longer than basal one (Fig. 8). Maxilla with a triangular cardo, one anterior seta on outer margin; stipes longer than wide, with four long setae and articulated digitiform setose mala; palpifer with three palpomeres; maxillary palpomere I as long as wide; maxillary palpomere II smaller than preceding one and with two apical setae; maxillary palpomere III twice length of palpomere II and becoming acute towards apex (Fig. 7). Mentum longer than wide, with two basal and two apical setae (Fig. 7). Labium with ligula present, narrowing apically; palpi with two palpomeres almost equal on size and shape (Fig. 7). **Thorax:** pro, meso and metanotum evident, not well sclerotized; pronotum longer than wide,

as long as head, concave (Figs. 3 and 9); mesonotum about half size of the pronotum, concave (Fig. 3); metanotum slightly smaller than mesonotum (Fig. 3). Pro, meso and metasterno not sclerotized, with one pair of spiracles (Fig. 4). **Legs:** coxa large and dilated, with three long setae on inner margin; femur not dilated, with setae distributed on outer and inner margin; tibia smaller than femur, with a two rows of setae on inner margin; tarsus with a long claw at the apex (Fig. 10). **Abdomen:** with ten segments; segments I–VIII wider than long with a lot of setae on posterior margin (Figs. 2 and 4); segment IX cylindrical, longer than wide, with four long posterior setae and with paired urogomphi; segment X conical shape, longer than wide and with two long apical setae (Fig. 11).

Second instar: length: 6–8 mm, width: 1.5–1.7mm. Cylindrical, slightly wider posteriorly than anteriorly, head smaller than pronotum. Body overall translucent, head slightly darker, and mandibles darker yellow; one pair of spiracles in the thorax between meso and metanotum, and well evident abdominal spiracles on segments I–VII (Figs. 12–15). **Head:** slightly wider than long, dorsal head with evident Y-shaped ecdysial suture starting at antennal cavities and reaching the base of head posteriorly; one diminutive stemma (= ocellus) each side of the head close to antennal insertion (Figs. 16–17). Antennae 3-segmented; 1° biggest one, slightly longer than wide; 2° subquadrate, about half size of the preceding one, with four apical setae, one diminutive sensory appendage on inner margin; 3° smallest, less than half of size of the preceding one, acute apex and with four setae, chaetotaxy scheme as in first instar. Labrum an irregular lobe, wider than long, with four apical setae, in same pattern as first instar. Mandibles as long as half of head; two setae, one on the middle and another on base; apex bifurcate, with apical part slightly longer than basal part (Fig. 19). Maxilla with a triangular cardo, one seta on outer margin on anterior part; stipes longer than wide; two setae on the middle and four setae on the apex; digitiform setose mala present; three palpomeres; maxillary palpomere I longer than wide; maxillary palpomere II as long as wide, about half size of the preceding one, with three setae, one basal setae and two apical setae; maxillary palpomere III acute, as long as the previous one (Fig. 18). Mentum longer than wide, with two basal and two medial setae (Fig. 18). Labium with ligula present, narrowing apically; palpi with two palpomeres about equal on size and shape (Fig. 18). Thorax: pronotum concave slightly sclerotized, wider than long, slightly longer than head (Fig. 20). Meso and metanotum same size, half size of pronotum, parallel sides (Figs. 21–22). Pro, meso e metasternum not well sclerotized, pale and with two large anterior setae (Fig. 15). **Legs:** coxa large and dilated, with three long setae on inner

margin; femur not dilated, with setae distributed on outer and inner margin; tibia smaller than femur, with two rows of setae on inner margin; tarsus with a long claw at the apex, same shape as the first instar (Fig. 10). **Abdomen:** with ten segments; segments I–VIII wider than long with mostly of setae on posterior margin; segment IX cylindrical shape, longer than wide, with eleven posterior setae and with a diminutive paired urogomphi (Fig. 23); segment X conical, longer than wide and with two long posterior setae (Fig. 23).

Third instar: Length: 5.5–6mm, width: 1.1–1.2mm. Elongate, flattened, slightly wider posteriorly than anteriorly, head smaller than pronotum. Body overall pale to yellowish, head, thorax slightly darker, mandibles dark yellow; one pair of spiracles on the thorax between meso and metanotum, and well evident abdominal spiracles on the segments I–VII (Figs. 24–27). **Head.** As long as wide, dorsal head with evident Y-shaped ecdysial suture starting at antennal cavities and reaching to the posterior part of the head; one diminutive stemma each side of the head closely to antennal insertion (Figs. 28–29). Antennae 3-segmented; 1° biggest one, slightly longer than wide; 2° subquadrate, about half size of the preceding one, with four setae on apical part, one diminutive sensory appendage on inner margin; 3° smallest, less than half of size of the preceding one, acute apex and with four setae, chaetotaxy same for the first instar. Labrum an irregular lobe, wider than long, with four setae on apical part. Mandibles as long as half of head; two setae, one on the middle and another on basal part; apex slightly bifurcated (Fig. 31). Maxilla with a triangular cardo, one seta on outer margin on anterior part; stipes longer than wide; two setae on the middle and four setae on the apex; digitiform setose mala present; three palpomeres; maxillary palpomere I longer than wide; maxillary palpomere II as long as wide, about half size of the preceding one, with three setae, one on basal part and two on the apical part; maxillary palpomere III acute, as long as the previously one (Fig. 30). Mentum longer than wide, with two basal and two medial setae (Fig. 30). Labium with ligula present, narrowing apically; palpi with two palpomeres about equal on size and shape (Fig. 30). **Thorax:** pronotum concave, sclerotized, wider than long, slightly longer than head, chaetotaxy scheme same as second instar (Fig. 20). Meso and metanotum same size, half size of pronotum, parallel sides chaetotaxy scheme as in second instar (Figs. 21–22) Pro, meso and metasternum not well sclerotized, pale and with two large anterior setae (Figs. 26–27). Legs: coxa large and dilated, with three long setae on inner margin; femur not dilated, with setae distributed on outer and inner margin; tibia smaller than femur, with a two rows of setae on inner margin; tarsus with a long claw at the apex, same as first instar (Fig. 10). **Abdomen:** with ten segments; segments I-

VIII wider than long, with most setae on posterior margin; segment IX cylindrical, longer than wide, with eleven posterior setae and with a diminutive paired urogomphi (Fig. 32); segment X conical shape, longer than wide and with two long setae on the apical part (Fig. 32).

Pupa. Length: 4–5mm, Width: 1.6–2mm. Overall body yellowish, mouth parts, antennae, legs and thorax translucent; eyes well evident and dark (Figs. 33–35).

Differences among instars. The first instar is quite different from other ones, not only by the size, but by the body shape, color and other parts of the body that are shown in Table 1. The first instar is very active in soil, have well developed sensory appendage and the last antennal segment black as is common for Aleocharinae’s larvae (Thayer et al. 2004). The first instar seeks for a host pupa and penetrates it. The second instar is very large when compared with the first instar, its translucent abdomen allows to see the gut and Malpighian tubules. The third instar is slightly smaller than second instar and more sclerotized. After the larva have eaten all the host, they exit from the puparium and make a cocoon with the substrate (in this case soil) to pupate.

Table 1. Major differences among larval instars of *Aleochara pseudochrysorrhoea*.

Characteristics	Instar I	Instar II	Instar III
Shape of body	Slender	Cylindrical	Elongated, flattened
Antennal article I	Small and subquadrate	Biggest one and longer than wide	Biggest one and longer than wide
Antennal article III	Dark	Same color of articles II and III	Same color of articles II and III
Sensory appendage	Evident	Diminutive	Diminutive
Mandibles	Curved on the middle, bifurcate, apical part shorter than basal one	Not curved on the middle, bifurcate, apical part slightly longer than basal one	Not curved on the middle, bifurcate, apical and basal part almost the same size
Head	Longer than wider	Wider than long	As long as wide
Thorax	Parallel sides	Concave	Concave
Urogomphus	Evident	Diminutive	Diminutive

References

- Ashe, J.S. & Watrous, L.E. (1984). Larval chaetotaxy of Aleocharinae (Staphylinidae) based on a description of *Atheta coriaria* Kraatz. **The Coleopterists Bulletin**, 38, 165–179.
- Caron, E.; Mise, K. M.; Klimaszewski, J. (2008). *Aleochara pseudochrysorrhoea*, a new species from southern Brazil (Coleoptera: Staphylinidae: Aleocharinae), with a complete checklist of Neotropical species of the genus. **Revista Brasileira de Zoologia**, 25, 827–842.
- Jonasson, T. (1994). Parasitoids of *Delia* root flies in brassica vegetable crops: coexistence and niche separation in two *Aleochara* species (Coleoptera: Staphylinidae). **Norwegian Journal of Agricultural Sciences**, 16, 379–386.
- Klimaszewski, J. (1984). A revision of the genus *Aleochara* Gravenhorst of America North of Mexico (Coleoptera: Staphylinidae: Aleocharinae). **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, 129, 1–211.
- Klimaszewski, J. & Jansen, R. E. (1993). Systematics, biology and distribution of *Aleochara* Gravenhorst from Southern Africa. Part I: subgenus *Xenochara* Mulsant & Rey (Coleoptera: Staphylinidae). **Annals of the Transvaal Museum**, 36, 53–107.
- Maus, C.; Mittmann, B.; Peschke, K. (1998). Host records of Parasitoid *Aleochara* Gravenhorst species (Coleoptera: Staphylinidae) attacking cyclorrhaphous Diptera. **Deutsche Entomologische Zeitschrift**, 45, 231–254.
- Mise, K. M.; Almeida, L. M.; Moura, M. O. (2007). Levantamento da fauna de Coleoptera que habita a carcaça de *Sus scrofa* L., em Curitiba, Paraná. **Revista Brasileira de Entomologia**, 51, 358–368.
- Newton, A.F. & Thayer, M.K. (2005) Catalog of higher taxa of Staphyliniformia and genera and subgenera of Staphylinidae [on line]. Available from URL <http://fm1.fieldmuseum.org/peet/?page=view&id=11356&searchtype=ggfg> [accessed on 22 February 2016].
- Peschke, K. & Fuldner, D. (1977). Übersicht und neue Untersuchungen zur Lebensweise der parasitoiden Aleocharinae (Coleoptera: Staphylinidae). **Zoologische Jahrbucher: Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere**, 104, 242–262.
- Souza, A. M. & Linhares, A. X. (1997). Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. **Medical and Veterinary Entomology**, 11, 8–12.
- Tabor, K. L.; Fell, R. D.; Brewster, C.C. (2005). Insect fauna visiting carrion in Southwest Virginia. **Forensic Science International**, 150, 73–80.
- Thayer, M.K.; Ashe, J.; Hanley, R.S. (2004). Discovery of the Remarkable Larvae of Hoplandriini (Coleoptera: Staphylinidae: Aleocharinae). **Annals of the Entomological Society of America**, 97, (4) 624–634.

Figures

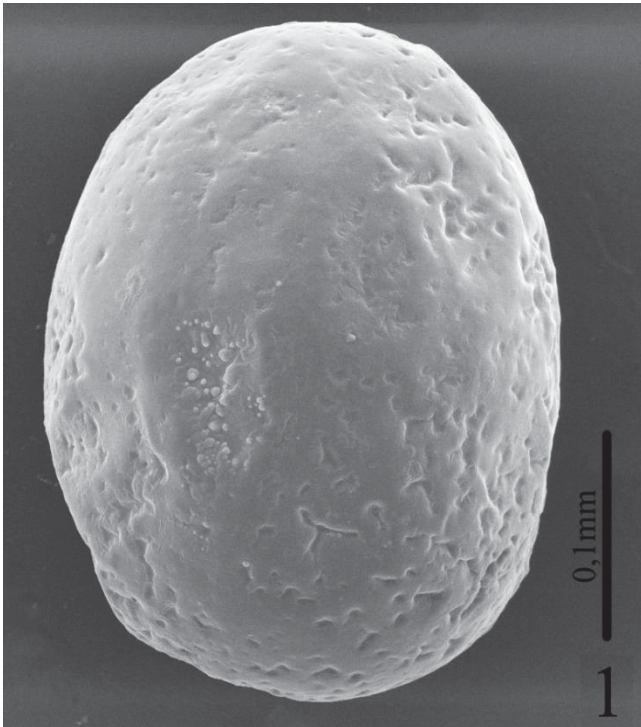


Figure 1. Scanning Electron Microscopy of the egg of the *Aleochara pseudochryssoroa*.



Figures 2–4. First larval instar of *Aleochara pseudochryssoroa*, Habitus. 2 and 3 dorsal view; 4, ventral view.

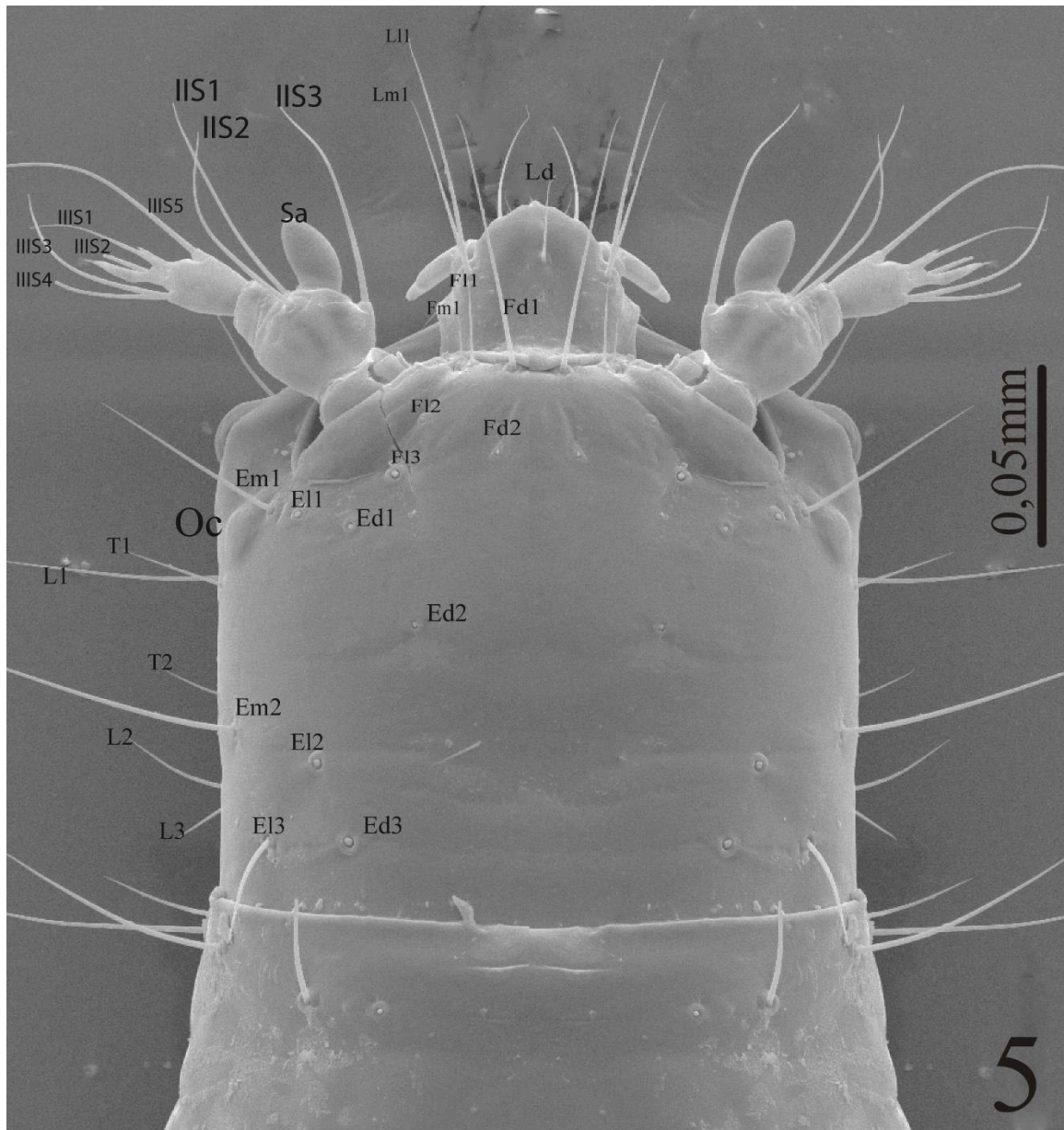
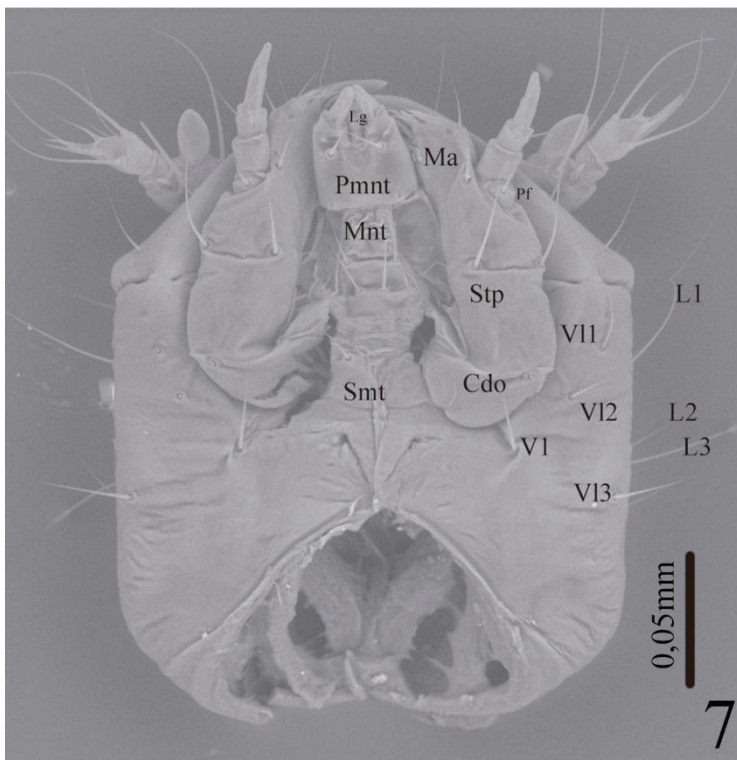
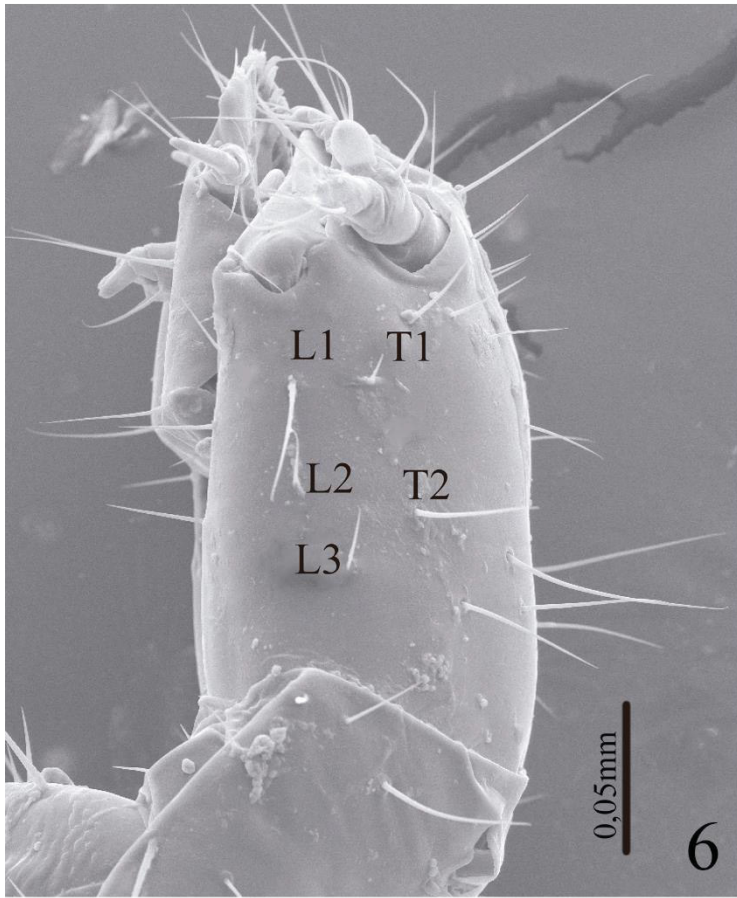


Figure 5. First larvar instar of *Aleochara pseudochryssoroa*, Scanning Electron Microscopy of the head with the chaetotaxy. Abbreviations: Ed, epicranial dorsal setae; El, epicranial lateral setae; Em, epicranial marginal; Fd, frontal dorsal setae; Fl, frontal lateral setae; Fm, frontal marginal seta; L, lateral setae; Ld, labium dorsal; Ll labium lateral; Lm, labium marginal; Sa, sensory appendage; SI, SII, SIII, solonedia of the antenar articles I, I, III respectively; Oc, ocellus= stemma; T, temporal setae.



Figures 6 and 7. First larval instar of *Aleochara pseudochryssoroa*, Scanning Electron Microscopy of the head with chaetotaxy. 6, lateral view; 7, ventral view. Abbreviations: Cdo, cardo; L, lateral setae; Lg, ligula; Ma, mala; Mnt, mentum; Pl, palpifer; Pmnt, prementum; Smt, submentum; Stp, stipe; V, ventral setae; VI, ventrolateral setae; T, temporal setae.

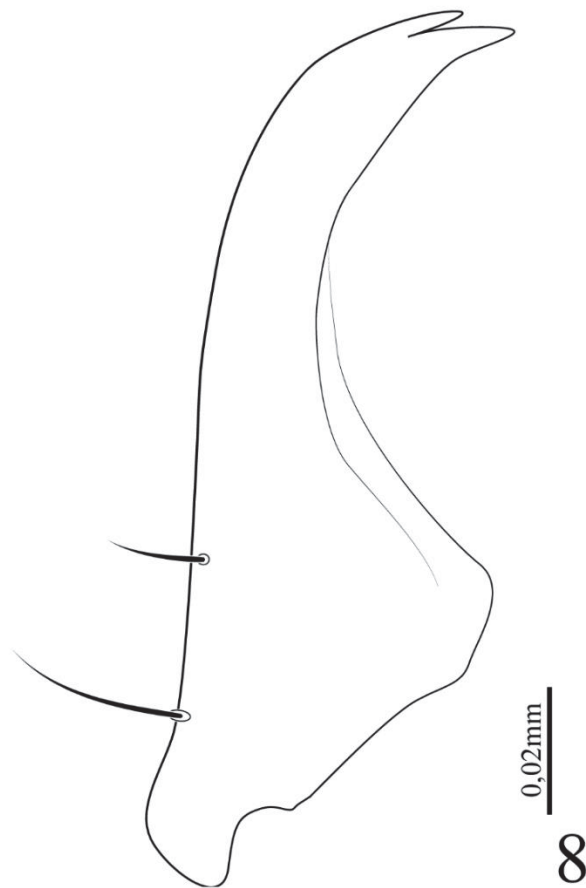


Figure 8. First larval instar of *Aleochara pseudochryssoroa*, left mandible on dorsal view.

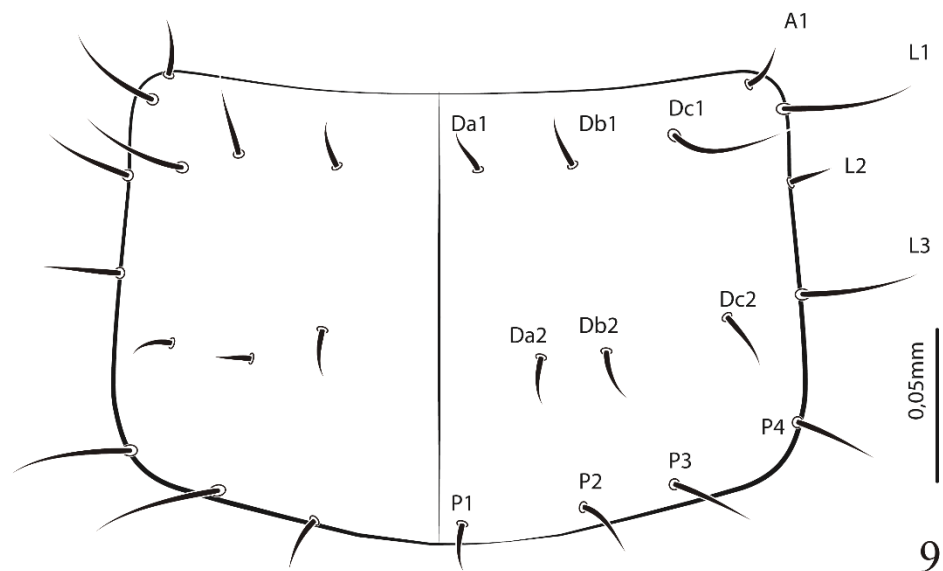
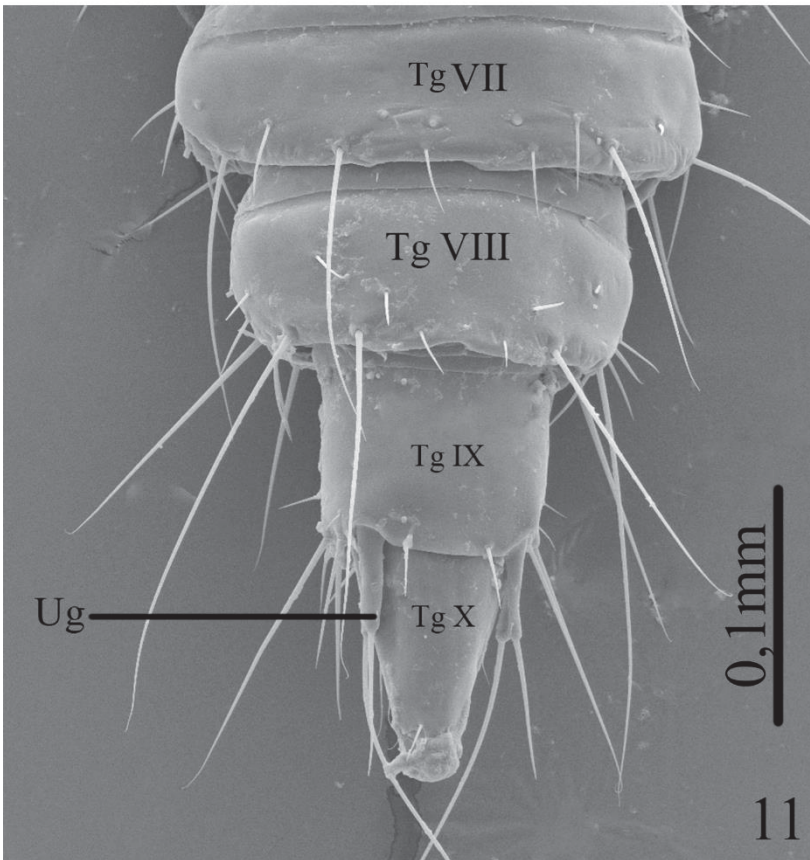
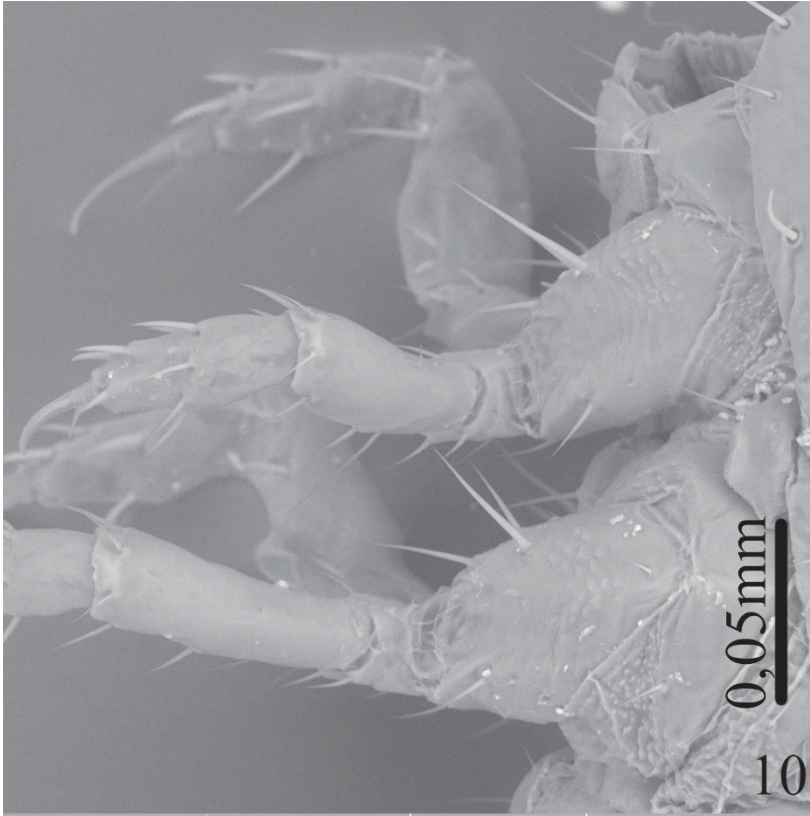


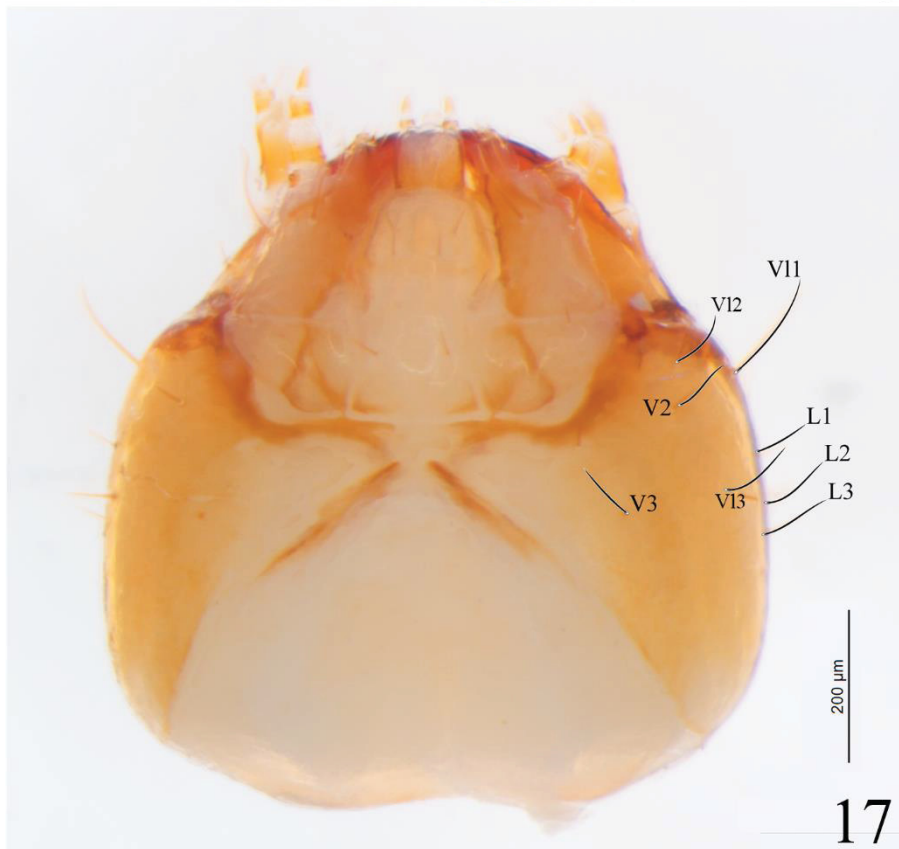
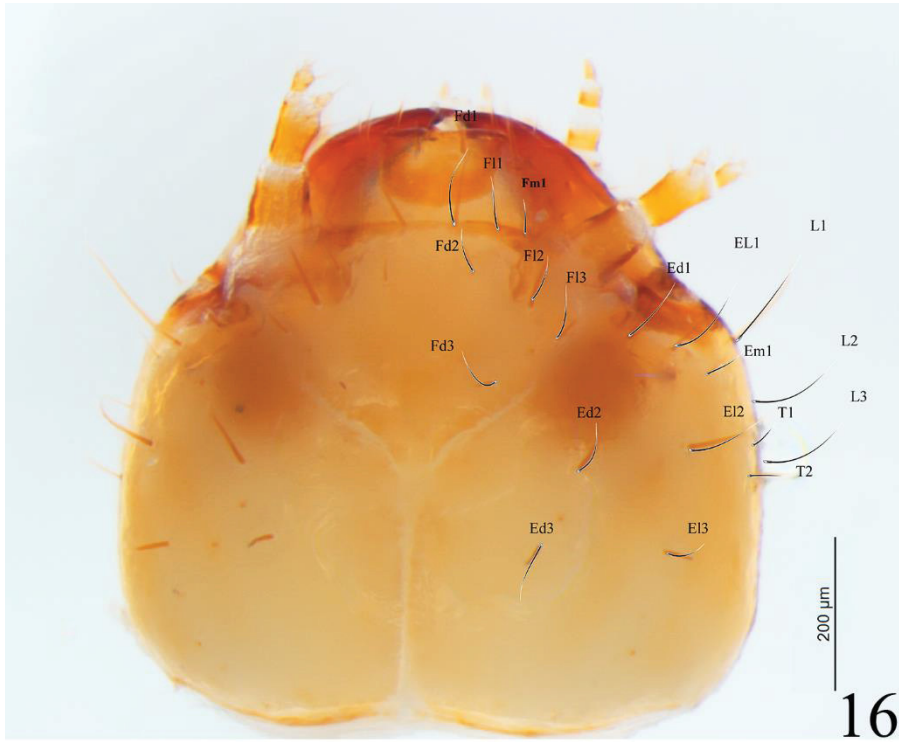
Figure 9. First larval instar of *Aleochara pseudochryssoroa*, Pronotum on dorsal view, with chaetotaxy. Abbreviations: A, anterior setae; D, dorsal setae; L, lateral setae; P, posterior setae.



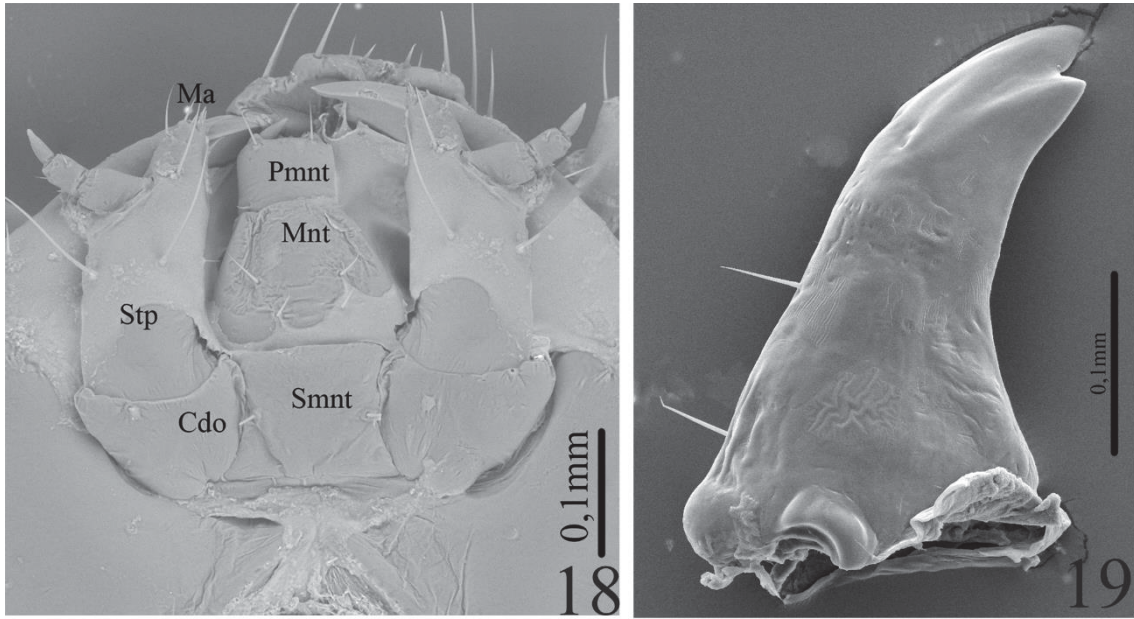
Figures 10 and 11. First larval instar of *Aleochara pseudochryssoroa*, Scanning Electron Microscopy. 10, pro and mesolegs; 11, last abdominal segments. Abbreviations: Tg, tergites; Ug urongomphus.



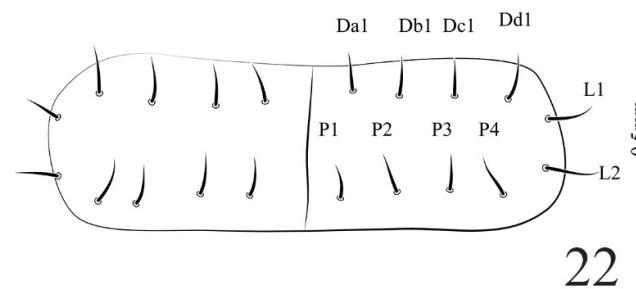
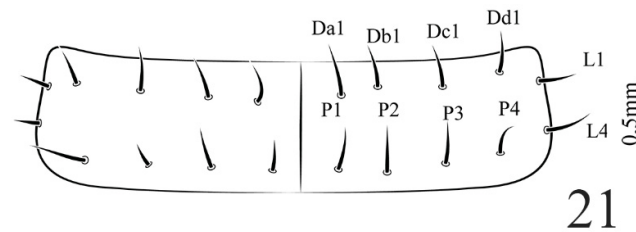
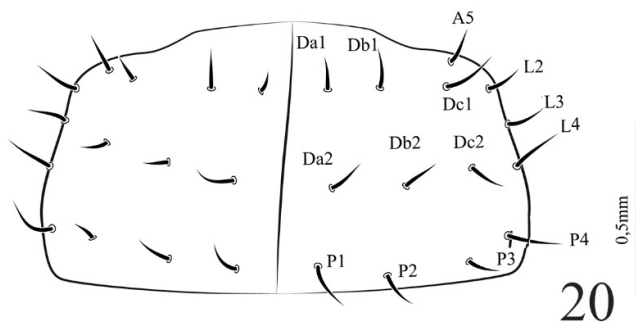
Figures 12–15. Second larval instar of *Aleochara pseudochryssoroa*, habitus. 12, body dorsal view; 13, head and thorax in dorsal view; 14, body in ventral view; 15, head and thorax in ventral view.



Figures 16 and 17. Second larval instar of *Aleochara pseudochryssoroa*, head with chaetotaxy. 16, head in dorsal view; 17, head in ventral view. Abbreviations: Ed, epicranial dorsal setae; El, epicranial lateral setae; Em, epicranial setae marginal; Fd, frontal dorsal setae; Fm, frontal marginal setae; L, lateral setae; V, ventral setae; V1, ventral lateral setae; T, temporal setae.



Figures 18 and 19. Second larval instar of *Aleochara pseudochryssoroa*, Scanning Electron Microscopy. 18, head in ventral view; 19, left mandible in dorsal view. Abbreviations: Cdo, cardo; Ma, mala; Mnt, mentum; Pmnt, prementum; Smt, submentum; Stp, stipe.



Figures 20–22. Second larval instar of *Aleochara pseudochryssoroa*, thorax. 20, pronotum; 21, mesonotum; 22, metanotum. Abbreviations: A, anterior setae; D, dorsal setae; L, lateral setae; P, posterior setae.

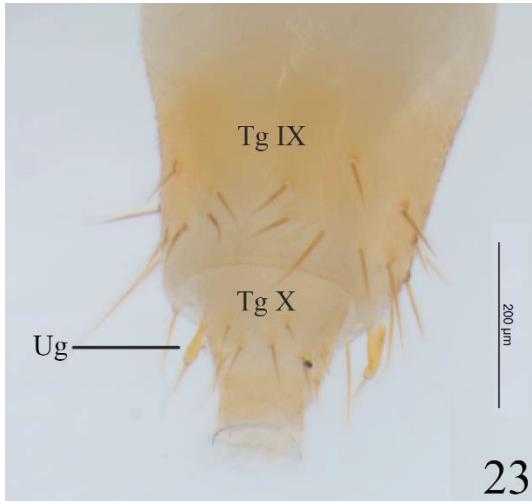
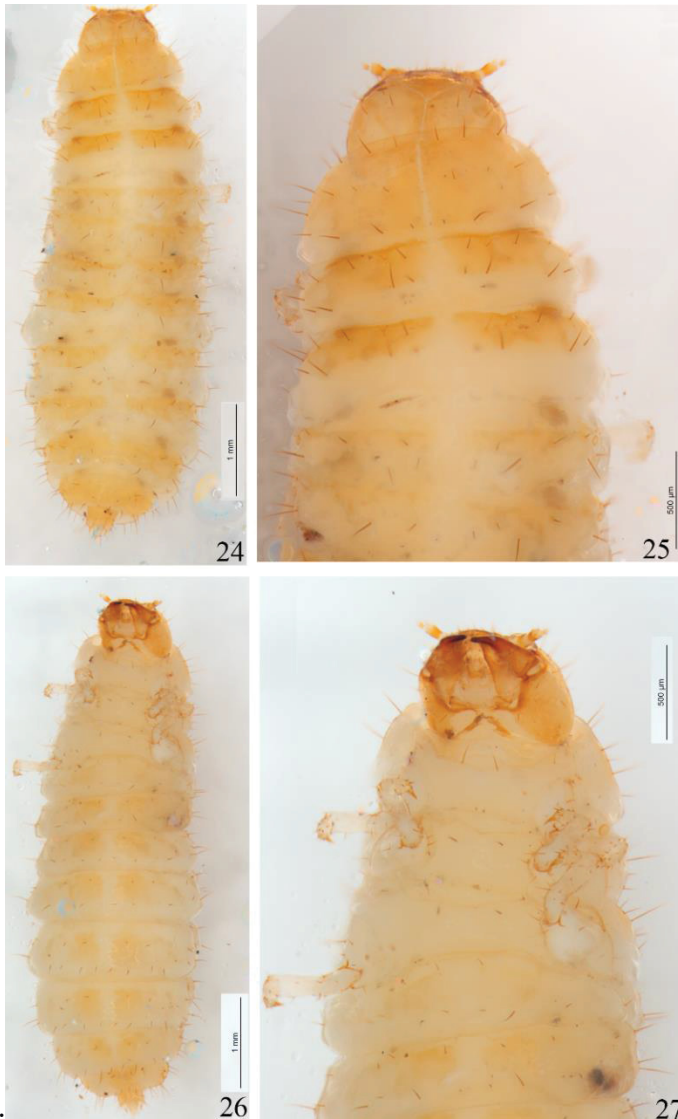
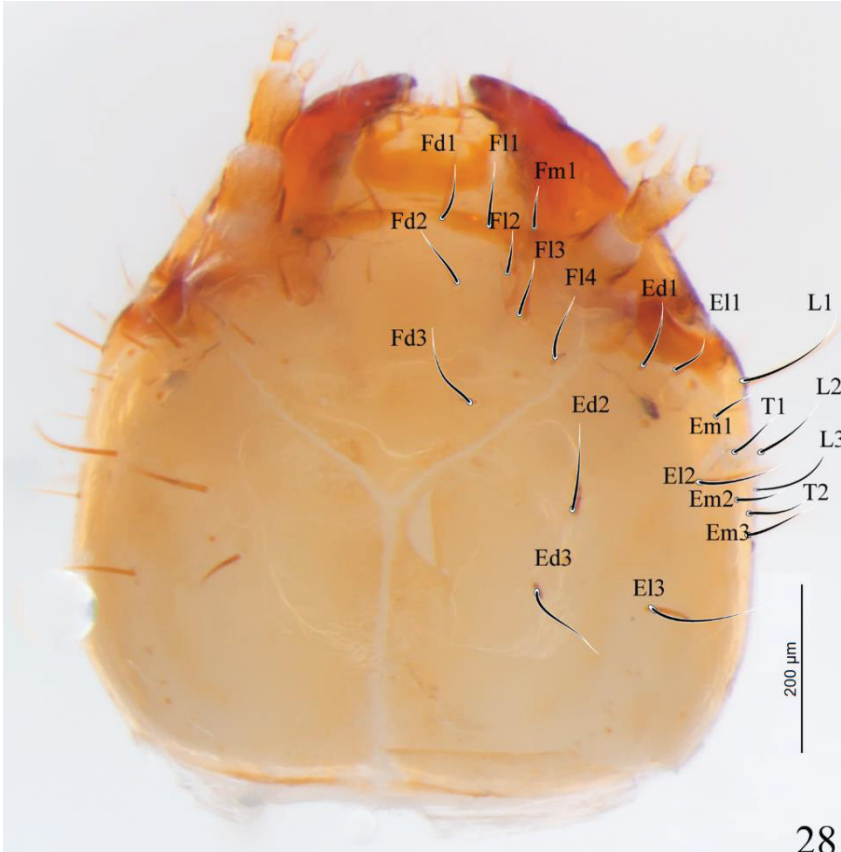


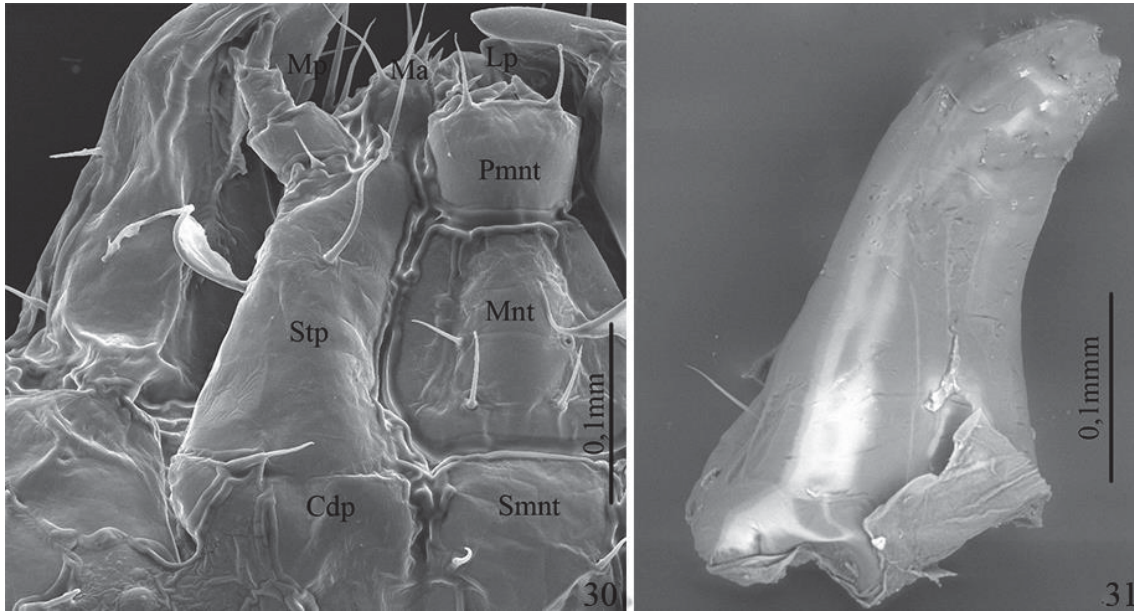
Figure 23. Second larva instar of *Aleochara pseudochryssoroa*, last abdominal segments. Abbreviations: Tg, tergite; Ug, urogomphus



Figures 24–27. Third larval instar of *Aleochara pseudochryssoroa*, habitus. 24 and 25, dorsal view; 26 and 27, ventral view.



Figures 28 and 29. Third larval instar of *Aleochara pseudochryssoroa*, head. 28, dorsal head; 29, ventral head. Abbreviations: Ed, epicranial dorsal setae; El, epicranial lateral setae; Em, epicranial setae marginal; Fd, frontal dorsal setae; Fm, frontal marginal setae; L, lateral setae; V, ventral setae; Vl, ventral lateral setae; T, temporal setae.



Figures 30 and 31. Third larval instar of *Aleochara pseudochryssoroa*, Scanning Electron Microscopy. 30, head in ventral view; 31, left mandible in dorsal view. Abbreviations: Cdo, cardo; Ma, mala; Mnt, mentum; Pmnt, prementum; Smt, submentum; Stp, stipe.

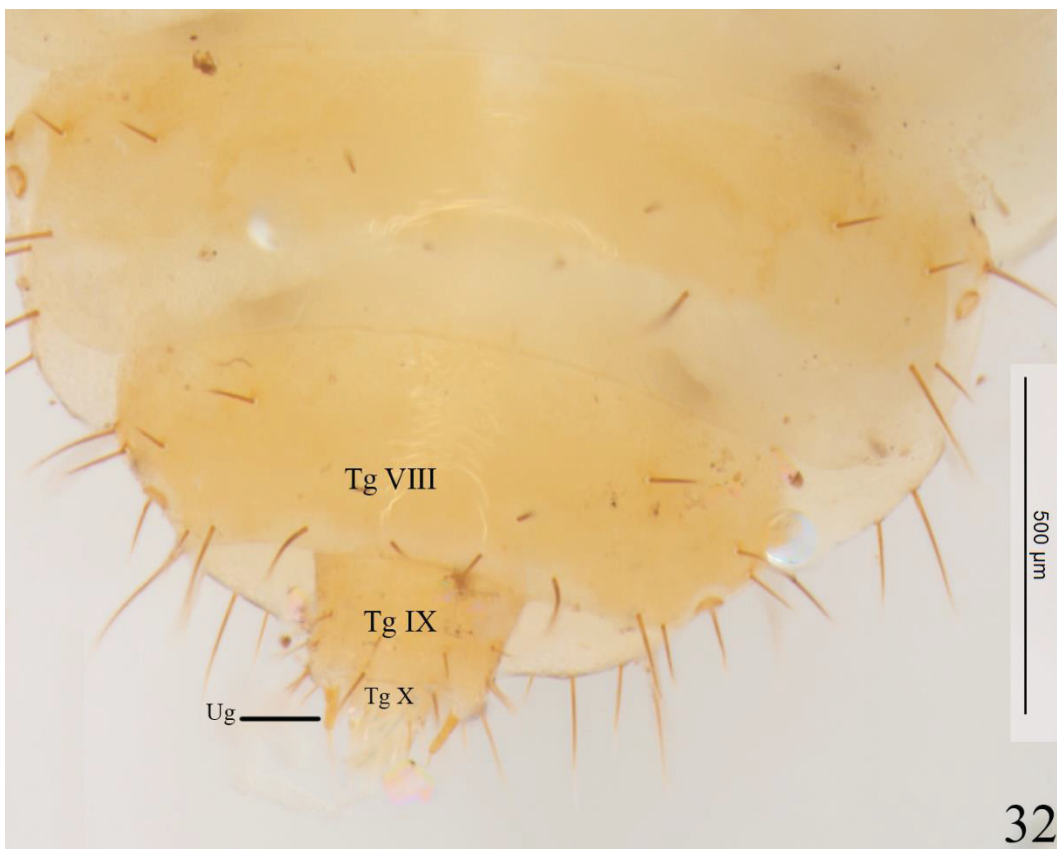


Figure 32. Third larval instar of *Aleochara pseudochryssoroa*, last abdominal segments. Abbreviations: Tg, tergite; Ug, urogomphus.



Figures 33–35. Pupa of *Aleochara pseudochryssoroa*. 32, dorsal view; 33, ventral view; 35, lateral view.

CAPÍTULO II

Are four better than two? Testing the attractiveness of a quaternary blend in males of *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera, Crambidae, Crambinae) in flight tunnel experiments

Resumo

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo, com estimativas de safras alcançando cerca de 600 milhões de toneladas por ano. *Diatraea saccharalis* é a principal praga relacionada à cultura de cana no Brasil. Devido ao ciclo de vida desta espécie ocorrer na sua maior parte dentro da cana-de-açúcar, métodos tradicionais de controle com inseticidas tem se demonstrado ineficientes no controle desta praga. Neste sentido, semioquímios como feromônios sexuais podem ser ferramentas importantes no monitoramento e controle desta praga. Dois compostos haviam sido descritos na literatura por desencadearem respostas nas antenas e terem respostas positivas na atração em túnel de vento em machos, (*Z,E*)-hexadeca-9,11-dienal e (*Z*)-hexadec-11-enal. Entretanto, a mistura destes dois compostos se mostrou ineficiente em testes de campo, o que levou a ideia de que alguns compostos minoritários presentes na mistura feromonal de *D. saccharalis* ainda não haviam sido identificados. Estudos realizados previamente reinvestigaram os compostos presentes nas glândulas feromonais de fêmeas e identificaram outros dois compostos que desencadeiam respostas nas antenas de machos, (*Z*)-hexadec-9-enal e hexadecanal. Portanto, o objetivo deste estudo foi testar a capacidade desses dois novos compostos em aumentar a atratividade de machos em experimentos de túnel de vento. Neste estudo, foi possível demonstrar que os dois novos compostos identificados nas glândulas feromonais de fêmeas de *D. saccharalis* aumentam a atratividade de machos em experimentos de túnel de vento.

Palavras chave: Brasil, cana-de-açúcar, pragas, feromônio sexual.

Abstract

Brazil is the biggest sugarcane producer in the world with an estimative of 600 hundred millions tons per year. *D. saccharalis* is the major pest insect attacking sugarcane crops in Brazil. Population control in traditional ways is quite inefficient due to simultaneous presence of all developmental stages of the insect throughout the year. In this way, search for new strategies can be useful such as the use of sex pheromone in monitoring and control techniques. Two sex pheromone components have been reported in the literature to elicit antennal activity and positive responses in flight tunnel experiments (*Z,E*)-hexadec-9,11-adienal and (*Z*)-hexadec-11-enal. However, attractiveness of these two compounds has been reported as very low in field tests. A previously study identified another two compounds in the female pheromonal gland to elicit antennal activity in males of *D. saccharalis*. Therefore, the goal of this study was to test if these two new identified compounds increase male attractiveness in flight tunnel experiments. Here, we demonstrate that these two new identified compounds, in fact, increase male attractiveness in flight tunnel experiments.

Keywords: Brazil, sugarcane, pest, sex pheromone.

1. Background

The sugarcane borer *Diatraea saccharalis* is the major pest insect attacking sugarcane crops in Brazil. The larvae of this insect feed in the stem of the plant, facilitating the introduction of phytopathogenic organisms (Mendonça 1996; Kalinova *et al.*, 2012). *D. saccharalis* larvae can kill the terminal meristem resulting a product of low quality which can lead to severe economical losses (Gómez & Lastra 1995; Vargas & Gómez, 2005; Leslie, 2007; Cortés *et al.*, 2014). When the insect infestation is equal to 1%, losses can reach 0.77% of the sugarcane weight, 0.25% of the sugar production and 0.20% of the ethanol production (Botelho *et al.*, 2004; Campos & Macedo, 2004; Lopes *et al.*, 2014).

Population control using pesticides is inefficient due to simultaneous presence of all developmental stages of the insect throughout the year. In addition, larval and pupal stages are protected inside the plant (Gomez & Lastra, 1995; Cortés *et al.*, 2010). Many strategies have been developed in order to decrease the damage caused by *D. saccharalis* in sugar cane crops, including biological control with the braconid larval parasitoid *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), manual collection of the larvae and cultivation of genetically modified varieties of sugarcane (Kalinova *et al.*, 2012). In this way, search for new strategies can be useful, such as the use of sex pheromone in monitoring and control techniques (Witzgall *et al.*, 2010; Trematerra, 2012).

Two sex pheromone components have been reported in the literature to elicit antennal activity in GC-EAD analysis of *D. saccharalis*. These compounds were identified as (*Z,E*)-hexadeca-9,11-dienal (*Z9,E11-16:Ald*) and (*Z*)-hexadec-11-enal (*Z11-16:Ald*) (Batista-Pereira *et al.* 2002; Kalinová *et al.*, 2005; Palacio-Cortés *et al.*, 2010). The blend of these two components in the ratio of 10:1 (*Z9, E11-16:Ald* and *Z11-16:Ald*) elicited a positive response in *D. saccharalis* males in wind tunnel bioassays comparable to the male response when assayed with virgin females extracts. However, attractiveness of these two compounds has not been confirmed by field tests (Kalinova *et al.*, 2012). The low attractiveness of this two component blend observed in field tests can be related to the lack of some minor compounds present in the crude pheromone of this species. Then, Palacio-Cortés (2010), performed a reinvestigation of the composition of female pheromonal glands and found out two more compounds to elicited antennal activity in males of *D. saccharalis*, (*Z*)-hexadec-9-enal and hexadecanal. Therefore, the goal of this study was to test if these two new identified compounds increase the attraction of males of *D. saccharalis* in flight tunnel experiments.

2. Material and Methods

2.1 Insects rearing

Diatraea saccharalis colony was established in the Pheromone group at Lund University, Lund, Sweden. Insects were reared under the following conditions: 24 ± 2 °C at 70% R.H. under a 12:12 L:D cycle. *D. saccharalis* larvae were fed with the artificial diet made with soy, sugar and wheat germ described by (Parra & Mishfeldt, 1992). Pupae were separated by sex before emergence and a 10% solution of sucrose was provided to adults as food.

2.2 Pheromone extraction

Pheromone component extraction was done according to a methodology described by Palacios-Cortez *et al.* (2010). Pheromone was obtained from 2-4 days virgin calling females, between the 5th and 7th hour of the scotophase. The pheromone gland was excised with forceps, transferred to conical vials for extraction at room temperature (10 µl hexane/gland/20 min) (Berger, 1972) and transferred to glass tubes. Extracts were stored at -20 °C until analyses.

2.3 Synthetic standards

Synthetic standards Z9, E11-16:Ald, Z11-16:Ald and Z9-16:Ald were purchased from Pherobank (Wageningen, NL). Hexadecanal (16:Ald) was acquired by the hydrogenation of Z11-16:Ald (Zarbin *et al.*, 2004).

2.4 Flight tunnel assays

Evaluation of male behavioral response to female crude extract, binary and the quaternary blend of synthetic EAD-active compounds was assayed in a 0.9×0.9×3 m Plexiglas flight tunnel at Lund University, Lund Sweden (see Svensson *et al.*, 2014). The assays were performed using 2-4 days old virgin males between the 6th and 7th hours of the scotophase at light condition of 1,5lx, 24-25 °C and 65-70% R.H. under 0.3m/sec airflow. Males were transferred to the flight tunnel room and individually placed in a glass cylinder of 98×22 mm 45 minutes before the beginning of the scotophase. An odor stimulus was prepared with 10 µl

of a test solution loaded on a small strip of filter paper or 100µl of a test solution loaded on a Wheton rubber septa, which was placed in a 35 cm-high metal holder at the upwind end of the flight tunnel. The odor stimuli was reapplied to the filter paper before a new male was assayed. Six behaviors were recorded: (1) no response; (2) activation (movement and winging fanning), (3) taking off (leave the release chamber), (4) oriented flight (flying in orientation to the plume), (5) flying at least 10 cm from odor source and (6) landing or source contact. All males were observed for 5 min from the introduction into the plume or until behavior (6) was observed.

Males were manipulated in order to produce four different experiments. Males were submitted to three different treatments in each experiment. Thirty males were used per treatment and males were used only once. **Experiment 1**, *Treatment 1*: males were assayed to 1 female equivalent (1FE) of female crude extract; *Treatment 2*: males were assayed to the binary blend (Z9,E11-16:Ald and Z11-16:Ald, 1ng per dose in the ratio 10:1); *Treatment 3*: males were assayed to the quaternary blend (Z9,E11-16:Ald, Z11-16:Ald, Z9-16:Ald and 16:Ald, 1ng per dose in the ratio 10:1:1:1). **Experiment 2**, *Treatment 1*: males were assayed to 1FE of female crude extract; *Treatment 2*: males were assayed to the binary blend (Z9,E11-16:Ald and Z11-16:Ald, 100 pg per dose in the ratio 10:1); *Treatment 3*: males were assayed to the quaternary blend (Z9,E11-16:Ald, Z11-16:Ald, Z9-16:Ald and 16:Ald, 100pg per dose in the ratio 10:1:1:1). **Experiment 3**, *Treatment 1*: males were assayed to the quaternary blend (Z9,E11-16:Ald, Z11-16:Ald, Z9-16:Ald and 16:Ald, 100pg per dose in the ratio 10:1:1:1); *Treatment 2*: males were assayed to the binary blend plus 16:Ald (Z9,E11-16:Ald, Z11-16:Ald and 16:Ald 100pg per dose in the ratio 10:1:1); *Treatment 3*: males were assayed to the binary blend plus Z9-16:Ald (Z9,E11-16:Ald, Z11-16:Ald and Z9-16:Ald 100pg per dose in the ratio 10:1:1). **Experiment 4 (wheaton rubber septa used as dispenser)**: In this experiment, the quaternary blend (Z9,E11-16:Ald, Z11-16:Ald, Z9-16:Ald and 16:Ald, in the ratio 10:1:1:1) was used in three different doses 20ng (*treatment 1*), 100ng (*treatment 2*) and 500ng (*treatment 3*) diluted in 100 µl of heptane.

2.5 Statistical analysis

Chi-square test was used to determine differences between the bioassays, using the behavior recorded landing or source contact (behavior 6) as the criteria to evaluate the differences between the stimuli (experiment-wise error of 0.05). All statistical analysis were performed using the software BioEstat 5.3.

3. Results

Experiment 1. All the three treatment had similar scores in the observed behaviors (1), (2), (3) and (4) (Table I). The major difference found between the treatments were on the behaviors (5) and (6), in which the treatment 1FE of the female gland extract presented the highest score, followed by the treatments of the quaternary blend and binary blend (Table I). Global Chi-square test on the behavior 6 showed a statistical differences between all three treatments ($\chi^2=29.023$, d.f.=2, $p=0.0001$) (Fig. 1a. Pairwise test showed significant differences between 1FE of female gland extract and the binary blend treatments ($\chi^2 =21.696$, d.f.=1, $p=0.0001$) and between 1FE of female gland extract and the quaternary blend treatments ($\chi^2=19.288$, d.f.=1, $p=0.0001$). No statistical difference was observed between the binary blend and the quaternary blend treatments ($\chi^2=0.111$, d.f.=1, $p=0.7$).

Experiment 2. Similar to experiment 1, the three treatments had comparable scores on the behaviors (1), (2), (3) and (4) (Table I). Treatments 1 and 3 had similar scores of responses (90% and 93%), while the treatment 2 had a decrease on the responses (73%) on the behavior (5) (Table I). Treatment 1 and 3 had similar scores on the behavior (6), while treatment 2 which presented the lowest score (Table I). The global Chi-square test with all treatments showed a statistical difference between treatments ($\chi^2=6.032$, d.f.=2, $p=0.04$) (Fig.1b). Pairwise test showed a statistical difference between 1FE of female gland extract and binary blend treatments ($\chi^2=7.177$, d.f.=1, $p=0.007$). No statistical differences was found between the 1FE of female gland extract and the quaternary blend treatments (pairwise test: $\chi^2=0.098$, d.f.=1, $p=0.75$). However, a statistical difference was found between the binary blend and quaternary blend treatments ($\chi^2=5.711$, d.f.=1, $p=0.01$).

Experiment 3. The behaviors (1), (2), (3), (4) and (5) had similar scores in all three treatments (Table I). The behavior (6) presented the highest score of responses in treatment 1, while treatment 2 had the lowest score (Table I). No statistical difference was found between the treatments in the global Chi-square test ($\chi^2=1.970$, d.f.=2, $p=0.37$).

Experiment 4: All the concentrations used had the same score for the behaviors (1), (2) and (3) (Table I). The behavior (4) presented similar responses for all concentrations. The behaviors (5) and (6) presented highest male response differences between all concentrations (Table I). The global Chi-square test showed a statistical difference between all concentrations ($\chi^2=20.795$, d.f.=2, $p=0.0001$). Pairwise test showed statistical differences between 100ng and 10ng concentration ($\chi^2=12.381$, d.f.=1, $p=0.0004$) and between 100ng and 500ng

concentration ($\chi^2=14.700$, d.f.=1, $p=0.0001$). No statistical difference was observed between male responses to 10ng and 500ng concentration ($\chi^2=0.162$, d.f.=1, $p=0.68$).

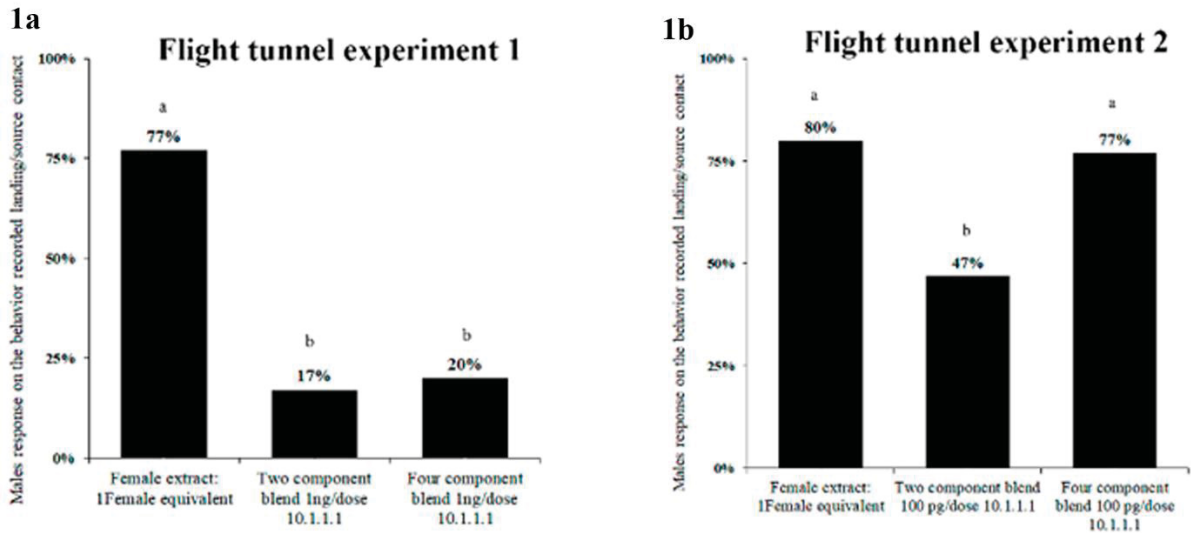


Figure 1. Results in percentage of male responses in flight tunnel experiment. **a**, results from experiment 1. **b**, results of the experiment 2. Different letter indicates statistical differences.

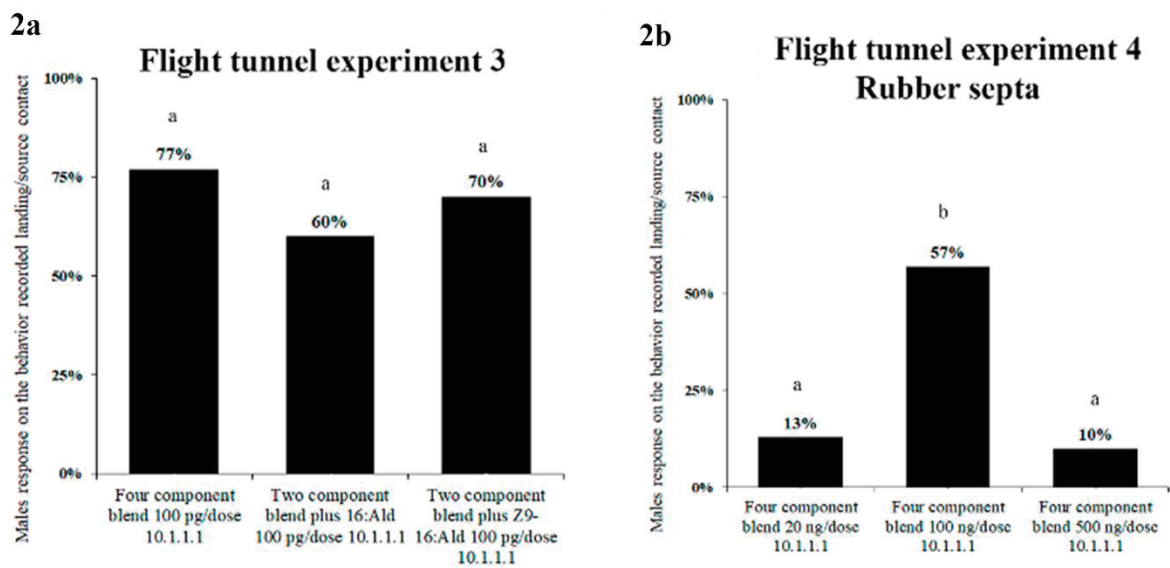


FIG. 5 Results in percentage of male responses in flight tunnel experiment. **A**, results from experiment 3. **B**, results of the experiment 4. Different letter indicates statistical differences.

Table I. Results of the flight tunnel assays results with 30 males used per treatment.

	No response	Activation/wing fanning	Taking off	Orientati on flight	Flying at least 10 cm from source of odor	Landing/ source contact
Experiment 1						
Female extract	0	30	30	26	24	23
Two componte blend 1ng/dose 10.1	0	30	30	22	8	5
Four component blend 1ng/ dose 10.1.1.1	0	30	30	28	14	6
Experiment 2						
Female extract	0	30	30	30	27	24
Two componte blend 100pg /dose 10.1	0	30	30	27	22	14
Four component blend 100pg/ dose 10.1.1.1	0	30	30	30	28	23
Experiment 3						
Four component blend 100pg/ dose 10.1.1.1	0	30	30	28	25	23
Two component blend plus 16:Ald 100 pg/dose 10.1.1	0	30	30	28	24	18
Two component blend plus Z9-16:Ald 100 pg/dose 10.1.1	0	30	30	27	24	21
Experiment 4- Rubber septa						
Four component blend 100ng/dose 10.1.1.1	0	30	30	20	11	4
Four component blend 20ng/dose 10.1.1.1	0	30	30	25	19	17
Four component blend 500ng/dose 10.1.1.1	0	30	30	22	8	3

4. Discussion

Lepidoptera sex pheromones are classified in four major different types based on chemical structure, biosynthesis and site of production (Ando *et al.*, 2004; Löfstedt *et al.*, 2016). Type I pheromones are saturated, monounsaturated or diunsaturated compounds with 10-18 carbon atoms with oxygenated functional groups acetates, alcohols and aldehydes and comprise about 75% of all identified moth sex pheromones (Ando *et al.*, 2004; Löfstedt *et al.*, 2016).

The family Crambidae has more than 9,655 described species (Nieuwerkerken *et al.*, 2011), from which 97 species had the sex pheromone identified. The majority of sex pheromones in this family are classified as Type I sex pheromones (about 95% of the species), but five species have been reported to use a mixture of Type I and II sex pheromones (Ando pherolist, 2018). The sex pheromone Type II are polyunsaturated unbranched hydrocarbon with a skeleton of C17-C25 carbon atoms, or the derivatives corresponding epoxide (Ando *et al.*, 2004; Löfstedt *et al.*, 2016).

All five *Diatraea* species that had the sex pheromone identified, produce the Type I sex pheromone *D. considerata* (Heinrich), *D. flavipennella* (Box), *D. grandiosella* (Dyar), *D. indigenella* (Dyar & Heinrich) and *D. saccharalis* (Fabricius). In fact, all of these species produce a mixture of aldehydes as sex pheromone, which varies from 16-18 carbons, the position of the unsaturation and the ratio between the compounds (Ando pherolist, 2018).

Diatraea saccharalis had the first sex pheromone compound identified by Hammond (1982) as the compound Z9E11-16:Ald, which is the major compound in the *D. saccharalis* pheromone blend. This compound was also identified as the major component of the sex pheromone of *D. indigenella* by Palacio-Cortes *et al.* (2014). Due to the low attractiveness of this compound in field tests, Batista-Pereira *et al.* (2002) and Kalinová *et al.* (2005) performed a reinvestigation of *D. saccharalis* sex pheromone and found Z11-16:Ald as an additional compound that elicited male antennal activity in GC-EAD analysis. This compound is one of the most common compound found in sex pheromone of Crambidae species and it was identified in 27 of 97 species (Ando pherolist, 2018). In *Diatraea* spp., Z11-16:Ald was identified as the major compound of the sex pheromone of *D. grandiosella* (Heding *et al.*, 1986), *D. considerata* (Gries *et al.*, 1998) and *D. flavipennella* (Kalinova *et al.*, 2012).

Two additional compounds that elicited antennal activity in male *D. saccharalis* were identified as Z9-16:Ald and 16:Ald (Palácio-Cortés, 2010). The compound Z9-16:Ald was also found in the pheromone blend of *D. grandiosella* (Heding *et al.*, 1986) and *D. flavipennella*

(Kalinova *et al.*, 2012). The saturated aldehyde 16:Ald was also identified as being part of the sex pheromone blend of *D. grandiosella* (Heding *et al.*, 1986) and *D. considerata* (Gries *et al.*, 1998).

The concentration of 1 ng per dose have been tested with the major compound of the *D. saccharalis* sex pheromone blend Z9,E11-16:Ald in flight tunnel experiment and no male positive response have been found (Svatoš *et al.*, 2001; Kalinova *et al.*, 2005), which corroborates with our results.

Wind tunnel experiments performed by Kalinova *et al.* (2005) had a positive response for binary blend in the concentration of 100 pg dose which was comparable to female extracts, corroborating with the results of this work. Our results shows that the Treatment 3 of the Experiment 2 (quaternary blend) in the concentration of 100 pg was more attractive to males of *D. saccharalis* in wind tunnel experiments than the Treatment 2 of the Experiment two (binary blend). These results could help explaining the low attractiveness of the binary blend observed in previously field experiments, once the two additional compounds (Z9-16:Ald and 16:Ald) increase the male attractiveness in wind tunnel assays. Treatment 3 in the Experiment 2 (quaternary blend) is the most suitable candidate for field test experiments, once it was the treatment that presented the highest score of male response in wind tunnel bioassays.

Despite the flight tunnel results with the rubber septa did not show the highest score of male responses in our experiments, this kind of dispenser is the most suitable dispenser to use in future field tests with *D. saccharalis*. These rubber septa has been used in field tests with positive responses in other *Diatraea* spp., such as *D. grandiosella* (Heding *et al.*, 1986), *D. considerata* (Gries *et al.*, 1998) and *D. flavipennella* (Kalinova *et al.*, 2012).

No studies have been reported to successful capture *D. saccharalis* in the field using traps baited with synthetic sex pheromone. We hope that the confirmation of increasing male attraction in flight tunnel promoted by these two additional pheromone compounds (Z9-16:Ald and 16:Ald) can be a stepforward for the elucidation of the chemical communication in *D. saccharalis* and improve the integrated pest management (IPM) of this major pest of sugarcane crops.

5. Conclusions

The sex pherome compounds in *Diatraea saccharalis* have been studied for at least three decades, in the tentative of use this compounds in pest mannegent intergrated programs for this

species. Since the first identification of a sex pheromone in this moth, field tests has been performed unsuccessfully. Probably because some minor compounds were missing from the full sex pheromone blend. Here, we identified two new minor compounds as part of the pheromone blend in this specie. Now, the sex pheromone blend is made of four identified compounds. In this way, we hope that the identification of this new compounds could be a stepforward in monitoring and controls program on this peste insects.

REFERENCES

- Ando, T.; Inomata, S. I.; Yamamoto, M. (2004). Lepidopteran sex pheromones. Pp. 51–96. In S. Schulz, ed. *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals I*, Vol. 239: **Topics in Current Chemistry**. Berlin: Springer.
- Ando, T. 2018. List of sex pheromones, Ando Laboratory. Available at: https://lepipheromone.sakura.ne.jp/pdb_top_eng.html
- Batista-Pereira, L. G.; Santangelo, E. M.; Stein, K.; Unelius, C. R.; Eiras, A. E.; Correa, A. (2002). Electrophysiological studies and identification of possible sex pheromone components of Brazilian populations of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Zeitschrift für Naturforschung**, 57, 753–758.
- Berger, R.S. (1972). 2,6-Dichlorophenol, sex pheromone of the lone star tick. **Science** 177, 704–705.
- Goméz, L. A.; Lastra, L. A. (1995). Los barrenadores de la caña de azúcar. **Serie Divulgativa**, Cenicafé 6.
- Gries, R.; Dunkelblum, E.; Gries, G.; Baldilla, F.; Hernandez, C.; Alvarez, F.; Perez, A.; Velasco, J.; Oehlschlager, A. C. (1998). Sex pheromone components of *Diatraea considerata* (Heinrich) (Lep.: Pyralidae). **Journal of Applied Entomology**, 122, 265–268.
- Hammond, A. M.; Fisher N. H. (1982). **Sugar Azacar**, 77, 32.
- Hedin, P. A.; Davis, F. M.; Dickens, J. C.; Burks, M. L.; Bird, T. G.; Knutson, A. E. (1986). Identification of the sex pheromone of the southwestern corn borer *Diatraea grandiosella* Dyar. *Journal of Chemical Ecology*, 12, 2051-2063.
- Kalinová, B.; Kindl, J.; Hovorka, O.; Hoskovec, M.; Svatos, A.; (2005). (11Z)-Hexadec-11-enal enhances the attractiveness of *Diatraea saccharalis* main pheromone component in wind tunnel experiments. **Journal of Applied Entomology**, 129,70–74.
- Kalinová, B.; Nascimento, R. R.; Hoskovec, M.; Mendonça, A. L.; Silva, E.L.; Freitas, C. R.; Cabral-Jr, C.E.; Silva, A.E.G.; Sant' Ana; Svatos. A. (2014). Identification of two components of the female sex pheromone of the sugarcane-borer *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera:Crambidae). **Journal of Applied Entomology**. 136, 203–211.
- Leslie, G., 2007. Pest of Sugarcane, in: Glyn, J. (Ed.), **World Agriculture Series**.

- Löfstedt, C.; Wahlberg, N.; Millar, J. M. (2016). Evolutionary patterns of pheromone diversity in lepidoptera. In: Allison, J. D.; Cardé, R. T. editors. Pheromone communication in moths: evolution, behavior and application. Berkeley: University of California Press. p. 43–78.
- Mendonca, A. F. (1996). Pragas da Cana-de-açúcar. **Insetos & Cia**, Maceio.
- Nieukerken, E. J.V.; Kaila, I. J.; Kitching, N .P.; Kristensen, D.C.; Lees, J.; Minet, C.; Mitter *et al.*, (2011). Order lepidoptera. in Z.Q. Zhang,ed. animal Biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. **Zootaxa**, 3148:212–221.
- Palacio-Cortés, A. M.; Zarbin, P. H. G.; Takya, D. M.; Bento, J. M. S.; Guidolin, A. S.; Consoli, F. L. (2010). Geographic variation of sex pheromone and mitochondrial DNA in *Diatraea saccharalis* (Fab., 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Insect Physiology**, 56, 1624–1630.
- Palácio-Cortez, A. M. (2010). Feromônio sexual, ADN mitocondrial e expressão das proteínas ligantes do feromônio de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) e avanços na identificação do feromônio sexual de *Diatraea indigenella* Dyar & Heinrich, (Lepidoptera: Crambidae). **Tese (Doutorado em Ciências Biológica. Área de concentração: Entomologia)** – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.
- Palacio-Cortés, A. M.; Fonseca, M. G.; Zarbin, P.H.G. (2014). Toward the dentification of the Sex Pheromone of *Diatraea indigenella* Dyar & Heinrich (Lepidoptera: Crambidae): Calling Behavior and Chemical Structure of a Major Component. **Neotropical Entomology**, 43, 526–531.
- Parra, J. R. P.; & Mishfeldt, L. J. (1992). Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. In: Anderson, T.E., Leppla, N.C. (Eds.), **Advances in Insect Rearing for Research and Pest Management**. Westview Press, Boulder, CO.
- Svatoš, A.; Kalinová, B.; Kindl, J.; Kuldová, J.; Hovorka, O.; Do Nascimento, R.R.; Oldham, N.J. (2001). Chemical characterization and synthesis of the major component of the sex pheromone of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, 66, 1682– 1890.
- Trematerra, P. (2012). Advances in the use of pheromones for storedproduct protection. **Journal of Pests Sciences**, 85:285–299.
- Witzgall, P.; Kirsch, P.; Cork, A. (2010). Sex pheromones and their impact on pest management. **Journal of Chemical Ecology**, 36:80–100.
- Vargas, G.A. & Gómez, L. A. (2005). Evaluación del daño causado por *Diatraea* spp. En caña de azúcar y su manejo en el valle del río Cauca. **Serie Divulgativa, Cenicaña**, 9.
- Zarbin, P.G.; Princival, J.L.; Lima, E. R.; Santos, A. A.; Ambrogi, B. G.; Oliveira, A. R. M., (2004). Unsymmetrical double Wittig olefination on the syntheses of

insect pheromones. Part 1: Synthesis of 5,9-dimethylpentadecane, the sexual pheromone of *Leucoptera coffeella*. **Tetrahedron Letters** 45, 239-241.

CAPÍTULO III

**Male release sex pheromone in the seed beetle *Pygiopachymerus lineola*
(Chevrolat, 1871) (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae)**

RESUMO

Os besouros da subfamília Bruchinae (Coleoptera, Chrysomelidae) são um grupo monofilético de espécies especializadas na predação de sementes. *Pygiopachymerus lineola* é uma espécie Neotropical encontrada desde o México até o Brasil, tendo sido relatada alimentando-se principalmente de sementes da espécie de planta *Cassia* L. Esta espécie de planta tem sido usada no Brasil como recomposição de áreas florestais degradadas e urbanismo. Até o momento, seis espécies dentro de Bruchinae tiveram compostos sexo específicos identificados. Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar os compostos feromonais em *P. lineola*, determinar o período de atividade circadiana e período de liberação de feromônio durante o ritmo circadiano. Os adultos foram coletados em vagens maduras de *Cassia leptophylla* no Centro Politécnico, campus da Universidade Federal Paraná (UFPR), localizado em Curitiba-PR, Brasil. Os voláteis foram coletados em câmaras de aeração e os extratos foram submetidos a análises de cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas (CG/EM). As análises de CG/EM mostraram quatro compostos sexo específicos nos machos. Experimentos realizados em olfatômetro em Y demonstraram uma alta atração de fêmeas aos extratos dos machos. Foi demonstrado também que o período de atividade e de liberação de compostos feromonais é maior nas três últimas horas da fotofase.

Palavras chave: Besouro, predador de semente, ritmo circadiano, feromônio sexual.

ABSTRACT

Seed beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) are a monophyletic group, specialized in seed predation. *Pygiopachymerus lineola* is a Neotropical species, which has been found from Mexico to Brazil and have been found mostly feeding on seeds of *Cassia* genus species. This plants species have been used as forest recompose of degradation area, ornamental and urban afforestation. Seed beetles sex pheromone have been identified only for six species to date. Therefore, the aim of this study was to identify the sex pheromone in *P. lineola* and improve the knowledge about sex pheromone in Bruchinae and determine the period of major activity and release pheromone throughout the circadian rhythm. Adults of the seed beetles were collected from *Cassia leptophylla* mature fruit valves collected in the Centro Politécnico campus of the Federal University of Paraná (UFPR), located in Curitiba-PR, Brazil. Headspace volatiles collection were performed and the extract were analyzed in GC/MS instrument. GC/MS analysis demonstrated four male specific compounds, which attracts female in Y-tube olfactometer assays. The period of more activity beyond the period of intense sex pheromone releasing occur in the last hours of photophase.

Keywords: Beetles, seed predator, circadian rhythm, sex pheromone.

1. Introduction

Seed beetles (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) are a monophyletic group, specialized in seed predation, which encompasses about 1,700 species (Johnson & Romero, 2004; Costa & Almeida, 2012). Most of seed beetles have a close host range with a small set of plant species. About 35 plant families have been reported as a host for bruchine species, although 85% of the species are recorded feeding on Fabaceae plants (Johnson & Romero, 2004). The bruchine feeding behaviour are dependent on the developmental stage, in which larvae feed only on seeds, whereas adults feed on pollen or nectar (Ribeiro-Costa & Almeida, 2012). The species *Pygiopachymerus lineola* (Chevrolat, 1871) is a Neotropical species, which has been found from Mexico to Brazil (Romero 2016; Cortés & Nápoles, 2016). This species has been found feeding in seeds of *Cassia* L. species (Caesalpinaceae) (Ribeiro-Costa & Costa 2002; Boscardin *et al.*, 2012). *Cassia* are Brazilian native species associated with secondary formation of Mixed Ombrophilous Forest. This plants species have been used as forest recompose of degradation area, ornamental and urban afforestation (Lorenzi, 2002; Carvalho, 2003; Pereira *et al.*, 2015). *Pygiopachymerus lineola* alimentation activity on seed of *C. fistula* causes effects in seeds germination and compromising the sexually production of seedlings (Boscardin *et al.*, 2012).

Sex pheromones are natural organic chemical molecules evolved to communication signal between organisms of the same species. To occur mating, sex pheromones attract the opposite sex even from a huge distances. Generally, sex pheromones are not a unique compound, they are a combination of molecules in a specific ratio, which can be highly species-specific or some species share the same compounds (Wyatt, 2014; Rodríguez, 2018). Seed beetles sex pheromone have been identified only for six species to date (Rodriguez, 2018). Therefore, the goal of this study was to improve the knowledge about sex pheromone and circadian rhythm in Bruchinae, by answering this five questions: Does the male extract from headspace volatile collection attract females? Does the male extract from headspace volatile collection attract males? Does the female extract from headspace volatile collection attract

males? What is the period of major activity during the circadian rhythm? What is the period during the circadian rhythm in which the specimens release the major amounts of the sex pheromone?

2. Material and methods

2.1 Insect collection

Adults of the seed beetles were collected from *Cassia leptophylla* mature fruit valves, which were collected in the Centro Politécnico campus of the Universidade Federal do Paraná (UFPR), located in Curitiba-PR, Brazil (S25.45, W49.23). The fruit valves were kept in plastic box (35 cm x 35 cm x 25 cm) in laboratory until the adults' emergence. Then, adults were sort of by sex and kept in group of ten insects in plastics boxes (10 cm X 6 cm) with a piece of cotton imbibed in 10% honey-water solution as food source. *Cassia leptophylla* mature fruit and the seed beetles were kept in laboratory with contolled conditions: 25 °C, 70% RH and 12:12 h L:D photoperiod (8am-8pm). Species identification and sex determination followed Ribeiro-Costa & Costa (2002) and Silva & Ribeiro-Costa (2008). All the beetles experiments described hereafter were performed in the same conditions described above.

2.2 Volatile collection

Headspace volatile collection was performed using a glass chamber (35 cm × 4.5 cm) with a piece of cotton imbibed in 10% honey-water solution as food source, at the same laboratory condition described above. Samples were collected by using a humidified and charcoal-filtered airflow at 1 L/min/chamber. The volatiles were trapped in glass tubes containing 20 mg of HayeSep Q 80–100 mesh (Altech, Lokeren, Belgium) and eluted with 400 µL of doubly distilled hexane. Extracts were collected every 72h for comparison of volatiles release by male and female. All extracts obtained were stored at -20 °C until analysis.

2.3 Pheromone production during the circadian rhythm

The extracts from headspace volatiles collection were evaluated every 12h in photophase (8am to 8pm) and scotophase hours (8pm to 8am) to establish the profile of

pheromone production (n=10). After the quantitative analysis of the headspace volatiles between photo and scotophase could be observed that during the photophase the seed beetles release the major amounts of pheromone. Then, during the photophase hours the extracts were evaluated each 3 hours (8am-11am, 11am-2pm, 2pm-5pm, 5pm-8pm) (n=12). Quantitative determination of the specific sex compounds identified were done using dodecane (C12) as internal standard.

2.4 Chemical analyses of the extracts

Analysis was performed in a GC/MS GC-QP 2010 Plus Shimadzu (electron impact) equipped with a GC-QP 2010 Plus Shimadzu and with a DB-5 column (30 m × 0.25 mm i.d. and 0.25 mm film thickness; Restek, Bellefonte, Pennsylvania, USA). Injections of 1 µL of extract were performed using splitless injection at 250 °C. The oven temperature started at 50 °C (1 min hold) and was ramped to 250 °C at a rate of 10 °C/min. Helium was used as the carrier gas at a column head pressure of 170 kPa. Retention indexes (RT) were calculated based on methodology proposed by Vandendool & Kratz, (1963) on a DB-5 column using commercial standards of *n*-alkanes (C10 to C26) as reference, using the same parameters described above.

2.5 Bioassays

Assays were performed with 2-6 days old virgin insects, in a binary choice Y-tube olfactometer, using humidified, charcoal-filtered air at 2 l.min⁻¹. The olfactometer consisted of a Y-shaped glass tube (15 cm × 10 cm). Odor source was pipetted in a filter paper (1 cm) and placed in one of the arms of the olfactometer (the arm of the Y-tube were change in each assays) and in the other arm solvent was pipetted in a filter paper (1 cm) used as control. After five assays the Y-tube were washed with water and solvent to avoid contamination. After the application of the stimuli, each insects were observed for the maximum of 5 minutes or until reach one or another odor source in the in the Y-tube olfactometer. The seed beetles were assayed until reach 30 responses, independently of the responses. The seed beetles were manipulated in order to performed three treatments: **Treatment 1:** Attraction of females by males extracts were tested with a 72h headspace volatile collection extract from males in the amount of 1 male equivalent (1ME), solvent was used as control. **Treatment 2:** Attraction of the males to males extract were tested with the extract of 72h of the males (1ME), solvent was

used as control. **Treatment 3:** Attraction of the males to females extract were performed using a female's extract of 72h 1 female equivalent (1FE) in males, solvent was used as control.

2.6 Circadian rhythm

Assays were performed with two days old virgin insects, 20 males and 20 females were sort of in four group in plastic box (10 cm x 6 cm) with a piece of cotton imbibed in 10% honey-water solution as food source. The seed beetles were continuously recorded in the laboratory for 72 h using a digital camera. The number of specimens which were walking to the arena were recorded. The video recorded were evaluated in each first 15 minutes of each hour.

2.7 Statistical analysis

Chi-square test was used to determine differences between the Y-tube olfactometer bioassays in the software BioEstat 5.3 (assays with no responses were not considered). Differences between the pheromone production during the photophase and escotophase was performed using the total amounts of the pheromone production (the sum of the four compounds) and tested by Shapiro-Wilk normality test, followed by Mann-Whitney (Wilcoxon rank-sum test) using the software R-Studio 3.5.1. Generalized linear model (GLM) were performed to evaluate the differences in the activity period throught the day of *Pygiopachymerus lineola* among hours and the pheromone production profile during the photophase hour using the software R-Studio 3.5.1. Generalized linear model (GLM) were performed using the Gamma and Inverse Gaussian family error distribution. The MASS (Venables and Ripley, 1999) and effects (Fox, 2003) libraries were utilized. Oneway ANOVA and Tukey's test were performed, using the multcomp library (Hothorn *et al.*, 2008). For all analyses, significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Extract analysis of *Pygiopachymerus lineola*

GC/MS analysis from extracts of the headspace volatiles collection of both sexes showed the presence of four male specific compounds (Fig. 1). The mass spectra fragments, Retention Time (RT) and Retention Index (RI) (Fig.2) of the four compounds suggests that these compounds are short chain carboxylic acids. These four compounds are under structural identification.

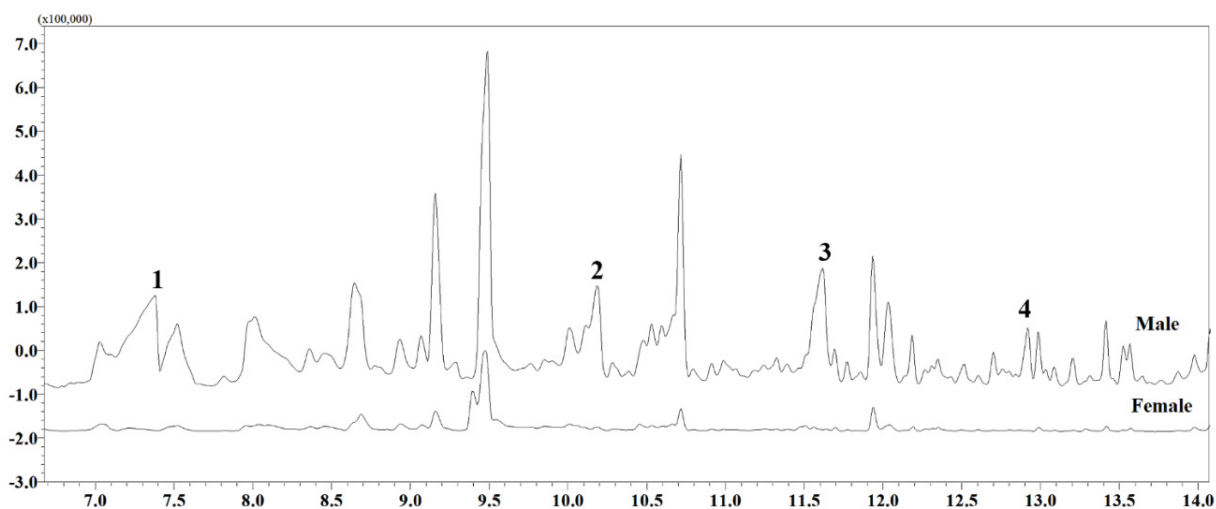
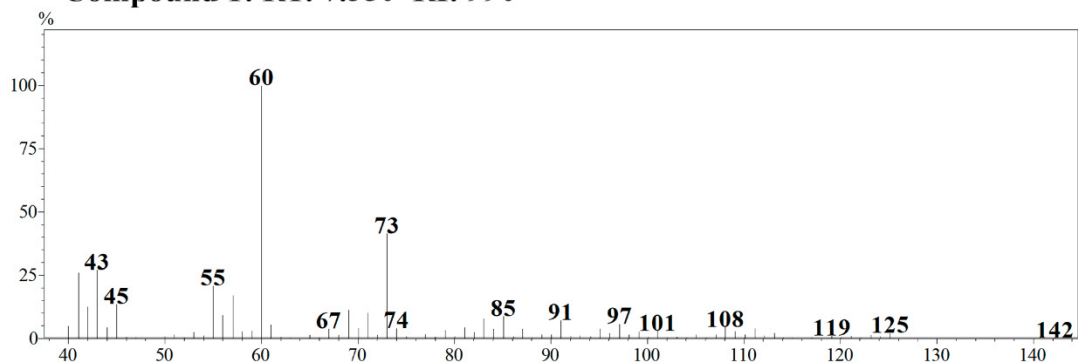


Figure 1: Chromatogram showing the four male specific compounds of *Pygiopachymerus lineola*.

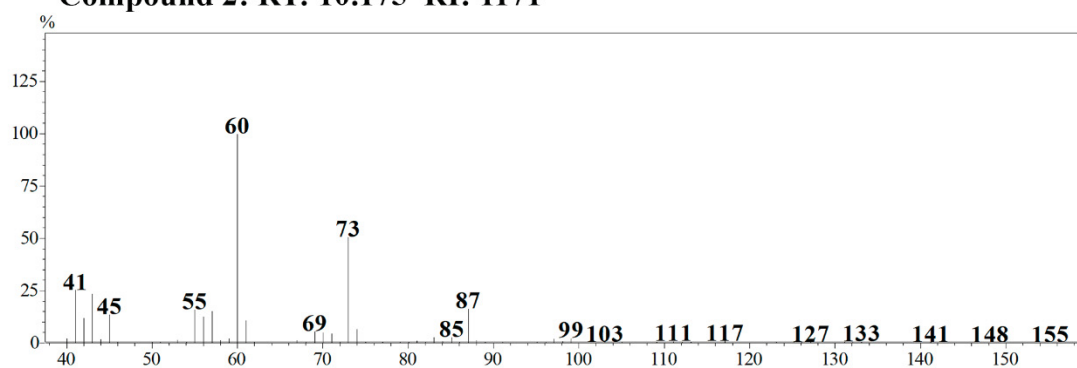
3.2 Quantification of the pheromone components

During 24h, each male insect emitted a mean amount of $0.92 \text{ ng} \pm 1.42$, (the sum of the four compounds), $0.3 \text{ ng} \pm 0.3$ (compound 1), $0.1 \text{ ng} \pm 0.2$ (compound 2), $0.3 \text{ ng} \pm 0.6$ (compound 3) and $0.1 \text{ ng} \pm 0.63$ (compound 4), in the ratio 3:1:3:1 respectively. *Pygiopachymerus lineola* release pheromone in both photo and escotophase hours, but, based on the sum of the four component blend, photophase hours has higher amounts of compounds than scotophase hours ($0.09 \text{ ng} \pm 0.08$ and $0.05 \text{ ng} \pm 0.04$), with a statistical differences between the phases (Wilcox test $p=0.00003$). During the daytime the last three photophase hours has the higher pheromone releasing (Fig. 3).

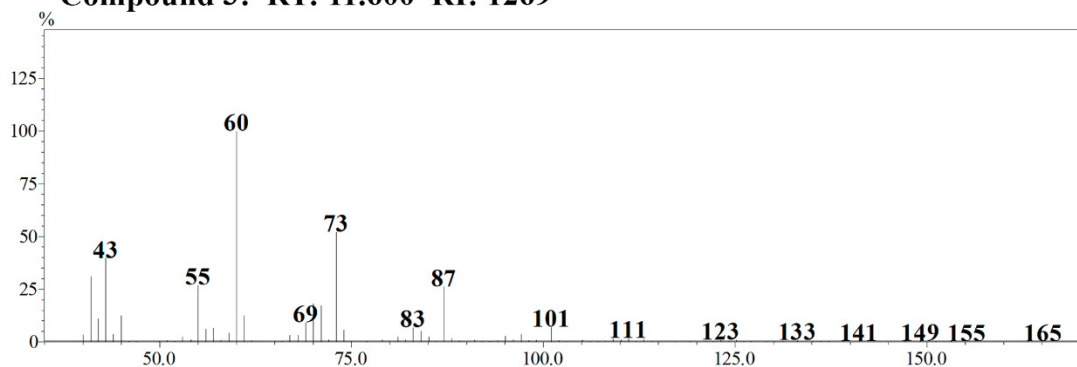
Compound 1: RT: 7.350 RI: 990



Compound 2: RT: 10.175 RI: 1171



Compound 3: RT: 11.600 RI: 1269



Compound 4: RT: 12.908 RI: 1362

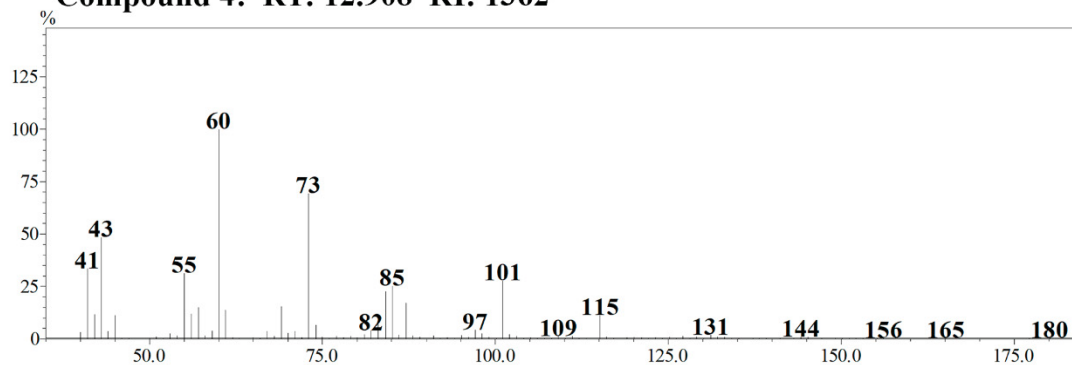


Figure 2: Mass spectra, Retention Time (RT) and Retention Index (RI) of the four male specific compounds of *Pygiopachymerus lineola*.

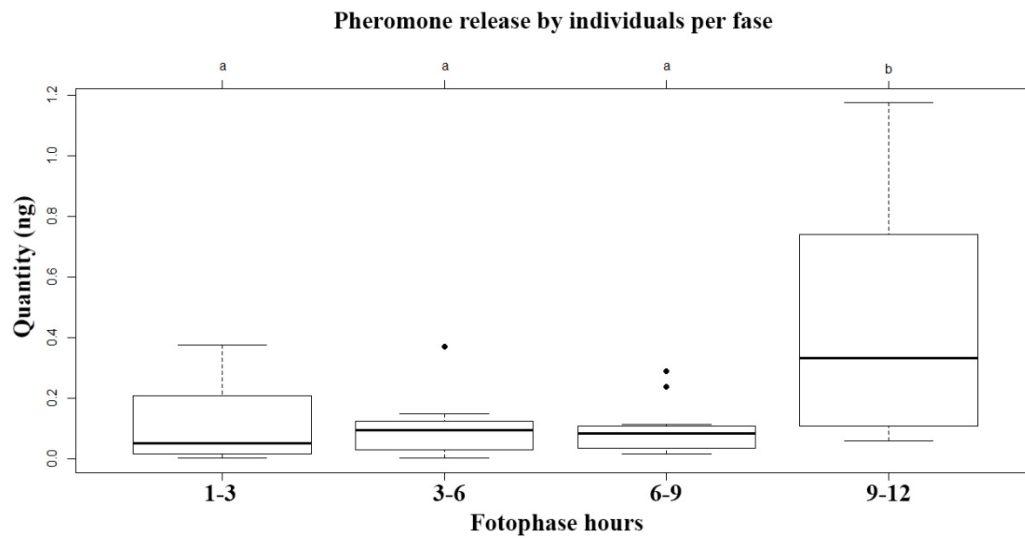


Figure 3. *P. lineola* male released pheromone during the photophase hours. Different letters indicates significant differences at $p < 0.05$ (using one-way ANOVA and Tukey's contrasts).

3.3 Circadian rhythm

Through the circadian rhythm males and females of *P. lineola* are more active during the daytime than during the nighttime (Fig. 4). In the daytime, males and females of *P. lineola* have the peak of activity during the last three hours of photophase (Figs. 5 and 6). There is no differences in the activity period between males and females (Figs. 5 and 6).

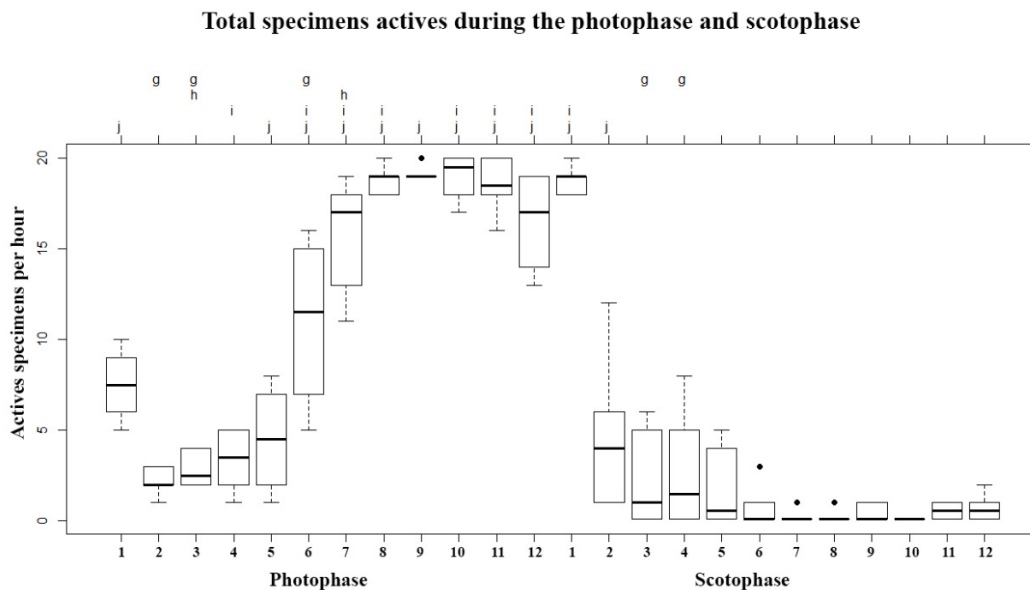


Figure 4. Circadian rhythm in *P. lineola* based on males and females activity. Different letters indicates significant differences at $p < 0.05$ (using one-way ANOVA and Tukey's contrasts).

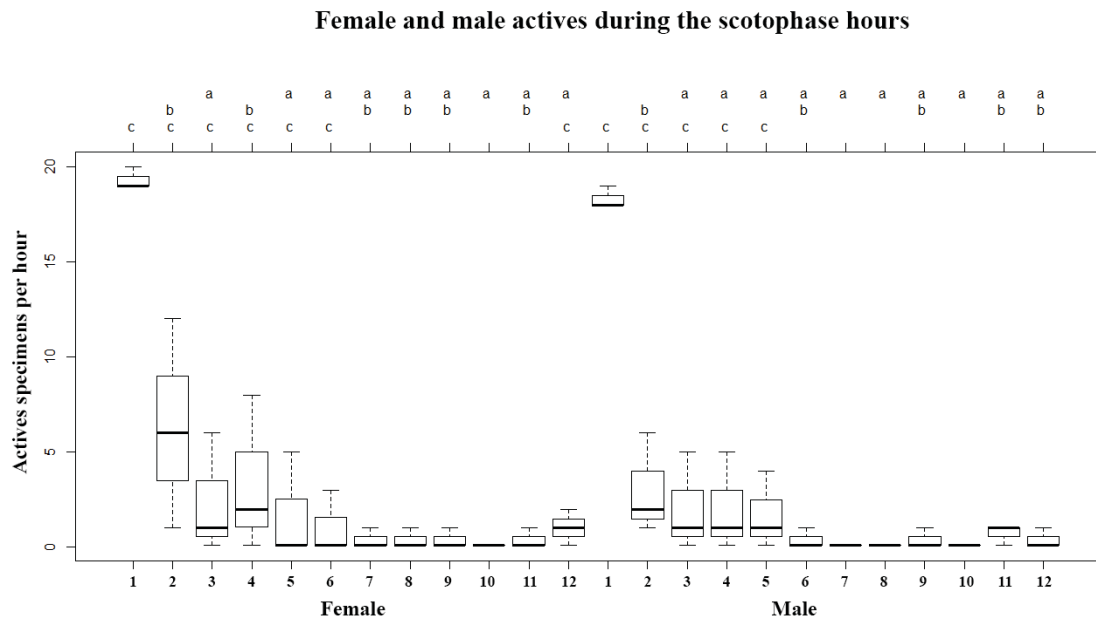


Figure 5. *P. lineola* activity during the scotophase based on males and females activity. Different letters indicates significant differences at $p < 0.05$ (using one-way ANOVA and Tukey's contrasts).

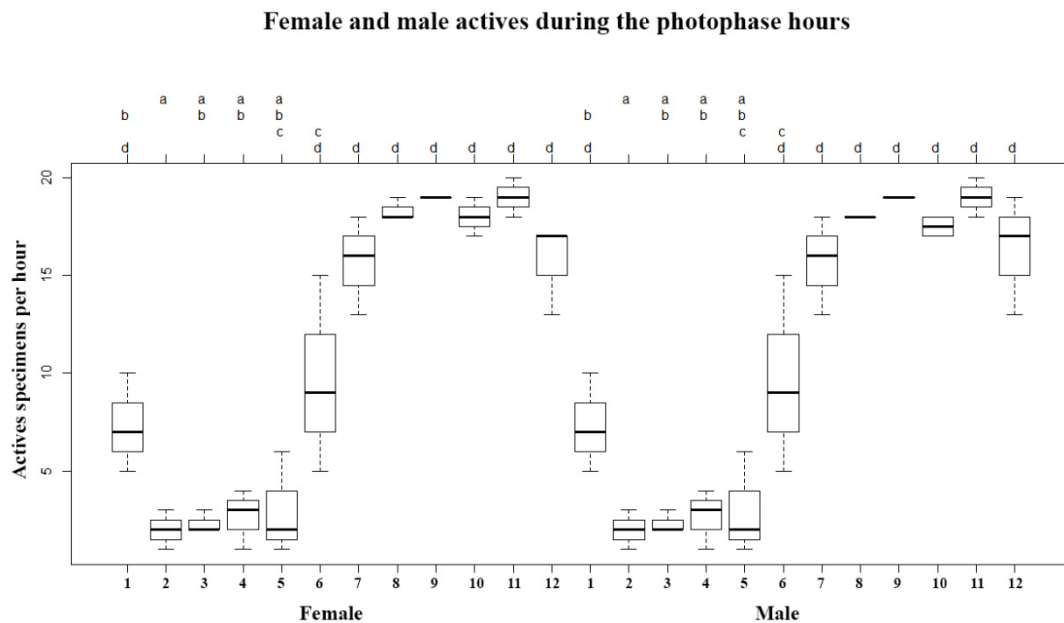


Figure 6. *P. lineola* activity during the photophase based on males and females activity. Different letters indicates significant differences at $p < 0.05$ (using one-way ANOVA and Tukey's contrasts).

3.4 Y-tube olfactometer assays

In the Treatment 1, using extract from male's volatiles collection (72h 1ME) females were high-attracted to the extract with of 86% of positive responses (Table I). Treatment 2,

males were less attracted to male extract than female 46% (Table I). Treatment 3, showed a low attraction of male to female extract 40% (Table I). The global Chi-square test showed a statistical difference between all treatments ($\chi^2=15.668$, d.f.=2, $p=0.0004$). Pairwise test showed statistical differences between Treatments 1 and 2 ($\chi^2=10.800$, d.f.=1, $p=0.0026$) and between Treatments 1 and 3 ($\chi^2=14.067$, d.f.=1, $p=0.0005$). There is no statistical differences between Treatments 2 and 3 ($\chi^2=0.271$, d.f.=1, $p=0.7945$). Absence of positive responses were not taken account in the statistics analysis.

Table I. Results of the Y-tube olfactometer assays with males and females of *P. lineola*.

	Extract	Solvent	No response
Treatment 1: Female attraction to male extract of 72h (IME)	26	4	7
Treatment 2: Male attraction to male extract of 72h (IME)	14	16	1
Treatment 3: Male attraction to female extract of 72h (IME)	12	18	1

4. Discussion

In laboratory bioassays performed with Y-tube olfactometer was possible to confirm that only females were attracted to male's volatiles from headspace collection, suggesting that males produces sex pheromone compounds. Male sex pheromone in Bruchinae have been previously identified only for two species, *Acanthoscelides obtectus* (Say), as an pheromone bouquet composed of allenic ester, aldehyde and sesquiterpenes (Horler, 1970; Vuts *et al.*, 2015) and *Bruchus rufimanus* (Boheman) as 1-undecene (Bruce *et al.*, 2010). Interestingly, male sex pheromone in *Pygiopachymerus lineola* is a blend of short chain carboxylic acids, which is similar to the sex pheromone of other Bruchinae species in which the female produce the sex pheromone as *Callosobruchus analis* (Fabricius) (Z)-3-methylhept-2-enoic acid (Cork *et al.*, 1990), *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) 3-methylheptanoic acid, (Z)-3-methylhept-3-enoic acid, (E)-3-methylhept-3-enoic acid, (Z)-3-methylhept-2-enoic acid, (E)-3-methyl-2-hept-2-enoic acid (Phillips *et al.*, 1996) and *Callosobruchus subinnotatus* (Pic) (E)-3-methylhept-2-enoic acid and (Z)-3-methylhept-2-enoic acid P. (Shu *et al.*, 1999).

Pygiopachymerus lineola have been reported attacking seed of *Cassia leptophylla* together with the other Bruchinae species *Sennius leptophyllicola* (Ribeiro-Costa & Costa 2002). Interestingly, in *Sennius leptophyllicola* the male release a sex pheromone composed of a short chain carboxylic acids very similar to the found in *P. lineola*. However, *S. leptophyllicola* the male release higher concentration of the sex pheromone compound in comparison with *P. lineola* (unpublished data).

Although there is similarity between the sex pheromone of *P. lineola* and the female sex pheromone of the genus species of *Callosobruchus*, these species are not phylogenetically related, they are classified in different subtribes (Acanthoscelidini Bridwell and Bruchidiini Bridwell, respectively). In this sense, *P. lineola* could be considered more related to *Acanthoscelides obtectus* and *Sennius leptophyllicola*, they are classified at the same tribe Acanthoscelidini (Johnson & Romero, 2004). Apparently, the sex pheromone molecules can vary even between species phylogenetically related, the species *Callosobruchus chinensis* (Shimomura *et al.*, 2008) and *Callosobruchus rhodesianus* (Pic) (Shimura *et al.*, 2010) produces homofarnesals as sex pheromone different from the three other species described above (Shimomura *et al.*, 2008; Shimomura *et al.*, 2010).

The sex pheromone of these seed beetles could be evolved in two different ways. First, species that have related type of pheromone molecules (as *Callosobruchus analis* (F.) (Cork *et al.*, 1990), *Callosobruchus maculatus* (F.) (Phillips *et al.* 1996) and *Callosobruchus subinnotatus* Pic (Shu *et al.*, 1999), *P. lineola* and *S. leptophyllicola* could have been part of an evolutionary process in which small changes in the components or a change in relative proportions of components over time. In such way that closely species share similarly compounds or even the same compounds (Roelofs and Brown, 1982; Shimura *et al.*, 2010). In the second, a process of major changes could lead to saltational shifts, and in this case, could generate new phenotypes that can be greatly or completely different from the antecedent (as in *Callosobruchus chinensis* (Shimomura *et al.*, 2008) and *Callosobruchus rhodesianus* (Pic)) (Shimura *et al.*, 2010) (Baker, 2002; Shimura *et al.*, 2010).

Our analysis of the circadian rhythm showed that *P. lineola* is more active during the daytime than nighttime hours, mostly during the last three hours of the photophase (Fig. 4). Similar results in the circadian rhythm was showed in *Callosobruchus maculatus* but, in this case, the period of major activity was during earlier hours of the daytime (Shu *et al.*, 1996). However, in *Callosobruchus subinnotatus* the period of major activity was demonstrated to be during the nighttime (Mbata *et al.*, 1997; 1999).

In the same way, the profile of pheromone production match the period of major activity in *P. lineola*, *Callosobruchus maculatus* and *Callosobruchus subinnotatus* (Shu *et al.*, 1996; Shu *et al.*, 1998; Mbata *et al.*, 1997; 1999). Even though, the species *Callosobruchus maculatus* (pheromone production during the daytime) and *Callosobruchus subinnotatus* (pheromone production during the nighttime) showed no statistical differences in the rates of captured insects between photophase and scotophase in experiments with pitfalls traps baited with sex pheromone (Mbata & Ramaswamy, 2000). The differences between the peak of major activity and pheromone production in congeneric species could be related to a mechanism that ensure the reproductive isolation (Mbata *et al.*, 2000).

5. CONCLUSIONS

Sex pheromone have been identified in few Bruchinae species, in most of cases, the molecules are a mixture of short chain carboxylic acids, which can be produced by males or females. Based on our analysis of *Pygiopachymerus lineola*, four male sex specific compounds were observed. It was demonstrated that the volatile extract from males attracted females, but did not attracted males in Y-tube olfactometer bioassays. Therefore, these four male specific compounds are proposed as sex pheromone because it is attractive only to the opposite sex. Initial chemical analysis strongly suggests that these four compounds are short chain carboxylic acids. It was also demonstrated that the most active period of *P. lineola* occurs in the last three hours of the day time, which match with the period of the day in which the specimens release the major amounts of sex pheromones.

References

- Baker, T.C. (2002). Mechanism for saltational shifts in pheromone communication systems. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 99:13368– 13370.
- Boscardin, J.; Costas, E. C.; Garlet, J.; Murari, A. B. (2012). Danos de *Pygiopachymerus lineola* (chevrolat, 1871) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) em sementes de chuva-de-ouro (*Cassia fistula* L.) utilizadas na arborização urbana de Santa Maria, RS. **Revista da Sociedade Brasileira de Urbanização Urbana**, 7, 4, 09-15.
- Bruce, T. J. A.; Martin, J. L.; Smart, L. E.; Pickett, J. A. (2011). Development of semiochemical attractants for monitoring bean seed beetle, *Bruchus rufimanus*. **Pest Management Science**, 67, 1303–1308.
- Carvalho, P. E. R. (2003). Espécies arbóreas Brasileiras. Colombo: **Embrapa Florestas**, 1040 p.
- Cork, A.; Hall, D.R.; Blaney, W.M.; Simmonds, M.S.J.; (1991). Identification of a component of the female sex pheromone of *Callosobruchus analis* (Coleoptera: Bruchidae). **Tetrahedron Letters**, 32, 129-132.
- Cortés, S. G.; Nápoles, J. R. (2016). First record of the genus *Pygiopachymerus* Pic (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) for Mexico. **Journal of Insect Biodiversity**, 5, 17, 1-6.
- Fox, J. (2003). Effect Displays in R for generalised linear models. **Journal of Statistical Software**, 8,1-9.
- Horler, D. F. (1970). (-)-Methyl n-tetradeca-trans-2,4,5-trienoate, an allenic ester produced by the male dried bean beetle, *Acanthoscelides obtectus* (Say). **Journal of Chemical Society C**, 859–862.
- Hothorn, T.; Bretz, F.; Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in general parametric models. **Biometrical Journal**, 50, 346-363.
- Johnson, C.D. & Romero, J. (2004). A review of evolution of oviposition guilds in the Bruchidae (Coleoptera). **Revista Brasileira de Entomologia**, 48, 3, 401–408.
- Lorenzi, H. (2002). Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: **Editora Plantarum**, 368p.
- Mbata, G.N.; Shu, S.; Ramaswamy, S.B. (1997). Rhythmicity of mating and oviposition in *Callosobruchus subinnotatus* (Pic) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Insect Behaviour**, 10, 409–423.

- Mbata, G.N.; Shu, S.; Ramaswamy, S.B. (1999). Responses of normal and active males of *Callosobruchus subinnotatus* to female sex pheromone. **Annals of the Entomological Society of America**, 92, 594–600.
- Mbata, G.N.; Shu, S.; Ramaswamy, S.B., (2000). Sex pheromones of *Callosobruchus subinnotatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: bruchidae): congeneric responses and role of air movement. **Bulletin of Entomological Research**, 90, 147-154.
- Pereira, C. M.; Vogel, H. F.; Moura, M. O. (2015). Insetos predadores de sementes de *Cassia leptophylla* e a relação entre os períodos pré e pós-dispersivos **Revista de Biologia Neotropical**, 12, 112-119.
- Phillips, T.W.; Phillips, J.K.; Webster, F.X.; Tang, R.; Burkholder, W.E. (1996). Identification of sex pheromones from cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*, and related studies with *C. analis* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Chemical Ecology**, 22, 2233–2249.
- Ribeiro-Costa, C.S. & Almeida, L. M. (2012). Seed-Chewing Beetles (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae). In: Panizzi, A.R. & Parra, J.R.P. (Eds.), *Insect Bioecology and Nutrition for Integrated Pest Management*. **CRC Press, Florida, USA**, pp. 325–352.
- Ribeiro-Costa, C.S. & Costa, A.S. (2002). Comportamento de oviposição de Bruchidae (Coleoptera) predadores de sementes de *Cassia leptophylla* Vogel (Caesalpinaceae), morfologia dos ovos e descrição de uma nova espécie. **Revista Brasileira de Zoologia**, 19 (1), 305–316.
- Rodríguez, S. A. (2018). Semiochemistry of the Bruchidae species. **Journal of Stored Products Research**, 77, 148-155.
- Roelofs, W. L.; Brown, R. L. (1982). Pheromones and evolutionary relationships of Tortricidae. **Annals Review of Ecology System**, 13:385–422.
- Romero N. J. (2016). Date Base BRUCOL. Programa de Entomología y Acarología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Estado de México, México.
- Shimomura, K.; Nojima, S.; Yajima, S.; Ohsawa, K.; (2008). Homofarnesals: female sex attractant pheromone components of the southern cowpea weevil, *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Chemical Ecology**, 34, 467-477.
- Shimomura, K.; Akasaka, K.; Yajima, A.; Mimura, T.; Yajima, S.; Ohsawa, K. (2010). Contact sex pheromone components of the seed beetle, *Callosobruchus analis* (F.). **Journal of Chemical Ecology**, 36:955–965.

- Silva, J.A.P. & Ribeiro-Costa, C.S. (2008). Morfologia comparada dos gêneros do grupo *Merobruchus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae): diagnoses e chave. **Revista Brasileira de Zoologia**, 25, 4, 802–826.
- Shu, S.; Koepnick, W. L.; Mbata, G. N.; Cork, A.; Ramaswamy, S.B. (1996). Sex pheromone production in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae): electroantennographic and behavioural responses. **Journal of Stored Product Research**, 32, 21–30.
- Shu, S.; Mbata, G. N.; Ramaswamy, S. B. (1998). Female sex pheromone in *Callosobruchus subinnotatus* (Coleoptera, Bruchidae): production and male responses. **Annals of the Entomological Society of America**, 91, 840–844.
- Shu, S.; Mbata, G. N.; Cork, A.; Ramaswamy, S. B. (1999). Sex pheromone of *Callosobruchus subinnotatus*. **Journal of Chemical Ecology**, 25, 2715-2727.
- Vandendool, H.; Kratz, P. D. (193). A generalization of retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, (11): 463.
- Venables, W.N. & Ripley, B.D. (1999). Modern Applied Statistics with S-plus. **Springer**, New York.
- Vutz, J.; Powers, S. J.; Caulfield, J. C.; Pickett, J. A.; Brikett, M. A. (2015). Multiple Roles of a Male-Specific Compound in the Sexual Behavior of the Dried Bean Beetle, *Acanthoscelides Obtectus*. **Journal of Chemical Ecology**, 41:287–293.
- Wyatt, T. D. (2014). Pheromones and Animal Behavior: Chemical Signals and Signature Mixes. Second Edition. Cambridge, UK: **Cambridge University Press**.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi desenvolvido abordando diferentes abordagens dentro da ecologia química. Uma parte do estudo foi dedicado a área aplicada e outra parte a estudos de ciência básica dentro da ecologia química. Nos estudos relacionados a ciência básica, com insetos não alvos de estudos em ecologia química, por não serem pragas agrícolas ou de produtos estocados. Este tipo de estudo é muito importante para um entendimento geral sobre a evolução dos compostos químicos nos diferentes grupos de espécies, sejam estes compostos mediadores de comportamentos de cópula, defensivos (*Aleochara pseudochrysorrhoea*) ou de atração de parceiros para a cópula (feromônios sexuais em *Pygiopachymerus lineola*).

Aleochara pseudochrysorrhoea apresenta uma glândula tergal cuja secreção possui dupla função no comportamento dos indivíduos. Uma vez que, dependendo da concentração, esta secreção pode ter uma função repelente ou agir como gatilho para início do comportamento de cópula, principalmente em machos.

Pygiopachymerus lineola libera compostos macho específicos considerados aqui como feromônios sexuais pelo fato de somente atrair fêmeas em bioensaios realizados em laboratório. Além disso, esta espécie apresenta um período de atividade mais intenso e uma maior liberação de feromônios durante as três últimas horas fotofase.

A parte da tese que foi desenvolvido na área aplicada, foi desenvolvida com a mariposa praga da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*. Insetos pragas de cultivares são os principais alvos de estudos em ecologia química, devido a sua aplicabilidade em programas de manejo integrado de pragas. Neste estudo, foi investigada a atratividade de uma mistura feromonal de quatro compostos que nunca antes havia sido testada. Nossos resultados mostram que essa mistura feromonal é altamente atrativa para machos em túnel de vento. Desta forma, este estudo pode ser considerado um importante passo para o programa de manejo integrado de para esta praga da cana-de-açúcar.

Apesar da natureza distinta dos estudos e a distância taxonômica entre os insetos abordados, os capítulos são conectados principalmente pelo objetivo da identificação dos compostos químicos presentes nos insetos bem como o estudo da sua importância no comportamento desses indivíduos. Nos diferentes estudos foram empregados métodos de extração, identificação e avaliação dos compostos químicos no comportamento.

De maneira geral, os objetivos pretendidos neste estudo foram cumpridos de forma satisfatória, uma vez que foi possível identificar compostos químicos presentes nos insetos alvos do estudo e avaliar suas funções biológicas. Além disso, trabalhar com insetos tão

diferentes é engrandecedor em termos de aprendizado, permitindo o aprendizado de diferentes técnicas de criação e manutenção de insetos, bem como de extração de compostos voláteis e avaliação do comportamento.