

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA GERMANI TORRENS

FEROMÔNIO DE *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE): IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE COMPORTAMENTAL

CURITIBA

2015

GABRIELA GERMANI TORRENS

FEROMÔNIO DE *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE): IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE COMPORTAMENTAL

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, no
Curso de Pós-Graduação em Entomologia, Setor de
Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Paulo H. Gorgatti. Zarbin

CURITIBA
2015

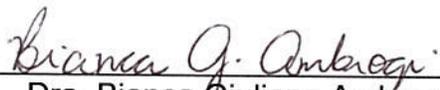
GABRIELA GERMANI TORRENS

“FEROMÔNIO DE *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE): IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE COMPORTAMENTAL”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências Biológicas”, no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Paulo Henrique Gorgatti Zarbin (Orientador)
(UFPR)



Dra. Bianca Giuliano Ambrogi
(UFS)



Dra. Angela Maria Palacio Cortés
(Pós-doc UFPR)

Curitiba, 10 de fevereiro de 2015.

Dedico a minha família, pelo incentivo e apoio sempre.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós Graduação em Entomologia pela oportunidade de realização do mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao Prof. Dr. Paulo H. Gorgatti Zarbin pela orientação.

A Daiane Szczerbowski, pela parceria no trabalho, sempre esclarecendo minhas dúvidas com muita paciência.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Semioquímicos, pelos ensinamentos, atenção e paciência, fundamentais para que esse trabalho se realizasse.

A Priscila Strapasson pelo convívio, uma nova e grande amiga.

A Delia Pinto, pelo agradável convívio e por ajudar nos caminhos a seguir.

A Camila Martins e Sandra Gomes, pelas considerações no trabalho.

Angela M. Palacio Cortès por ter acompanhado todas as dificuldades e conquistas.

A Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira (CEPLAC) pela parceria.

Ao Mauro A. C. de Macedo Rodrigues pelo desenvolvimento do trabalho de campo.

A Chemtica International pelo preparo das iscas com feromônio utilizadas em campo.

A Stephanie Pereira além de dividir o 506, por compartilhar os momentos de descontração e também momentos de tensão do mestrado, sempre apoiando.

Aos meus pais, Bernadete Germani e João Carlos S. Torrens, meus maiores exemplos, por estarem sempre perto, mesmo quando longe.

Ao meu irmão, Pablo Torrens, pelo carinho e incentivo.

Ao meu fiel amigo Toshio pelo companheirismo e por me proporcionar muita alegria.

Aos demais amigos, por compreenderem minha ausência. Obrigada pela amizade, que seja para sempre.

*“O amor por todas as criaturas viventes é o mais nobre atributo do homem.”
Charles Darwin*

RESUMO

A broca-dos-frutos do cacau e do cupuaçu, *Conotrachelus humeropictus* é a principal praga destas culturas, pois suas larvas se desenvolvem dentro dos frutos, tornando-os impróprios para comercialização. O controle desta praga é problemático em função dos ovos e larvas estarem protegidos dentro dos frutos, tornando o controle químico pouco eficiente. Com o objetivo de identificar os componentes feromonais de *C. humeropictus* e testar sua atratividade em laboratório e no campo, aerações de machos e fêmeas foram realizadas e extratos de ambos os sexos foram coletados e analisados. As análises comparativas dos perfis de voláteis de machos e fêmeas indicaram a presença de quatro compostos macho-específicos (A, B, C e D). Os compostos A, C e D foram identificados através de comparações com espectros de massas e coinjeções com padrões sintéticos: (A) grandisol, (1*R*,2*S*)-1-metil-2-(1-metiletenil)-ciclobutanoetanol; (C) ácido grandisóico, (1*R*,2*S*)-1-metil-2-(1-metiletenil)-ciclobutanoacético e (D) uma lactona derivada do ácido grandisóico, 2,2,6-trimetil-3-oxabicyclo[4.2.0]octan-4-ona, um composto inédito nunca antes descrito na natureza, o composto B encontra-se em processo de identificação. A quantificação realizada com o composto majoritário revelou que um inseto produz em média 235 ± 73 ng de ácido grandisóico por dia. Através da coleta de voláteis durante a fotofase e escotofase foi possível observar que a emissão do feromônio ocorre com maior intensidade durante a escotofase ($76 \pm 3\%$). Os testes de atratividade em laboratório, realizados em olfatômetro em Y, permitiram avaliar o comportamento de *C. humeropictus* frente aos compostos sintéticos (A, C e D). Eles revelaram a atratividade de machos para a mistura grandisol (A) + ácido grandisóico (C). Já os testes com fêmeas demonstraram que a lactona influenciou na atratividade quando testada no conjunto, grandisol (A) + lactona (D) e ácido grandisóico (C) + lactona (D), no entanto, ambos os compostos isolados (A e C) não foram atrativos. Testes preliminares de campo realizados na estação experimental da CEPLAC, em Ouro Preto do Oeste, Rondônia (BR), avaliaram a atratividade de *C. humeropictus* ao ácido grandisóico (C) e à mistura ácido grandisóico (C) + lactona (D), e não se mostrou eficiente. A ausência do composto B, em processo de identificação, pode alterar os resultados de atratividade de *C. humeropictus* à mistura feromonal em laboratório e em campo.

Palavras-chave: cacau, cupuaçu, grandisol, ácido grandisóico, olfatômetro em Y, teste de campo.

ABSTRACT

The weevil, *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae), a fruit borer of cocoa and cupuaçu fruits is the main pest of these cultures because it develops inside the fruits turning them inadequate for commercialization. The control of this pest is problematic because eggs and larvae are protected inside the fruits making the chemical control less effective. With the objective of identifying the pheromonal components of *C. humeropictus* and testing its attractiveness in laboratory and field tests, aerations of male and females were performed and extracts were collected and analyzed. Comparative analyses of males and females volatile profiles indicated the presence of four male specific compounds (A, B, C and D). The compounds A, C and D were identified through mass spectra comparisons and co-injections with standards: (A) grandisol, (1*R*,2*S*)-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-cyclobutaneethanol; (C) grandisoic acid, (1*R*,2*S*)-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-cyclobutaneacetic acid; and (D) a lactone derived from the grandisoic acid, 2,2,6-trimethyl-oxabicyclo[4.2.0]octan-4-one, a new compound, not yet described in nature. Compound B is still in process of identification. Quantification based on the major compound showed that one insect produces in average 235 ± 73 ng of grandisoic acid per day. Using volatile collections of both photophase and scotophase, it was observed that pheromone emission occurs mostly during scotophase ($76 \pm 3\%$). Attractiveness tests were conducted in the laboratory with a Y tube olfactometer to evaluate the behavior of *C. humeropictus* to synthetic compounds (A, C and D). They revealed the attractiveness of males to the mixture grandisol (A) + grandisoic acid (C). However, female tests revealed that the lactone influenced attractiveness when it was tested in the following combination grandisol (A) + lactone (D) and grandisoic acid (C) + lactone (D), since both compounds alone (A and C) were not attractive. Preliminary field tests that were performed on the experimental station of CEPLAC, in Ouro Preto do Oeste, Rondônia (BR) evaluated the attractiveness of *C. humeropictus* to grandisoic acid (C) and the blend grandisoic acid (C) + lactone (D), though it was not effective. The absence of compound B which is still in the process of identification might alter the attractiveness results of *C. humeropictus* to the pheromonal mixtures both in the laboratory and in the field.

Keywords: cocoa; cupuaçu; grandisol; grandisoic acid; Y tube olfactometer; field test.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. A - ÁRVORE DE CACAU (<i>Theobroma cacao</i>) B - ÁRVORE DE CUPUAÇU (<i>Theobroma grandiflorum</i>).....	13
FIGURA 2. A - ADULTO DE <i>Conotrachelus humeropictus</i> . B – LARVA DE <i>Conotrachelus humeropictus</i> E O DANO REALIZADO EM UM FRUTO DE CUPUAÇU.....	17
FIGURA 3. EXEMPLO DE ESTRUTURAS QUIRAIS: MOLÉCULA DE SULCATOL, FEROMÔNIO DE <i>Gnathotrichus materiarius</i> E <i>G. sulcatus</i>	26
FIGURA 4. DIMORFISMO SEXUAL DE <i>Conotrachelus humeropictus</i> , BASEADO NA DIFERENCIAÇÃO DOS SEGMENTOS ABDOMINAIS ENTRE MACHOS (A) (SETA INDICANDO O 6º SEGMENTO ABDOMINAL PRESENTE APENAS NOS MACHOS) E FÊMEAS (B) (SETA INDICANDO O 5º SEGMENTO ABDOMINAL DAS FÊMEAS).	30
FIGURA 5. A. SISTEMA DE AERAÇÃO DE MACHOS E FÊMEAS SEPARADOS, JUNTAMENTE COM CANA-DE-AÇÚCAR COMO FONTE ALIMENTAR. B. PROCESSO DE DESSORÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS: (ACIMA) COLUNA COM POLÍMERO ADSORVENTE (ABAIXO) O EXTRATO FORMADO.....	31
FIGURA 6. OLFATÔMETRO TIPO “Y” UTILIZADO PARA TESTAR ATRATIVIDADE DOS INSETOS AOS COMPOSTOS SINTÉTICOS IDENTIFICADOS DA SUA MISTURA FEROMONAL DE <i>Conotrachelus humeropictus</i>	36
FIGURA 7. A. ÁREA DE ISOLAMENTO DE ÁRVORE DE CACAU NO CAMPO EXPERIMENTAL DA CEPLAC, EM OURO PRETO DO OESTE (RO). B. ARMADILHA UTILIZADA PARA CAPTURA DOS INSETOS.....	40
FIGURA 8. COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DE EXTRATOS DE AERAÇÃO (48 HORAS) DE MACHOS (ACIMA) (N=6) E FÊMEAS (ABAIXO) (N=6) DE <i>Conotrachelus humeropictus</i>	43
FIGURA 9. ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO A, GRANDISOL.	44
FIGURA 10. ANÁLISES COMPARATIVAS DA QUIRALIDADE DO COMPOSTO NATURAL COM AMOSTRAS SINTÉTICAS DE GRANDISOL (ISÔMERO 1R2S E MISTURA RACÊMICA) EM COLUNA QUIRAL.....	45
FIGURA 11. ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO C, ÁCIDO GRANDISÓICO.	46
FIGURA 12. ANÁLISES COMPARATIVAS DA QUIRALIDADE DO COMPOSTO NATURAL REDUZIDO COM AMOSTRAS SINTÉTICAS DE GRANDISOL (ISÔMERO 1R2S E MISTURA RACÊMICA) EM COLUNA QUIRAL.	47
FIGURA 13. ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO D, UM COMPOSTO INÉDITO, 2,2,6-TRIMETIL-OXABICICLO[4.2.0]OCTAN-4-ONA.	48
FIGURA 14. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE VOLÁTEIS DE MACHOS E FÊMEAS DE <i>Conotrachelus humeropictus</i> , INDICANDO NOS COMPOSTOS A (GRANDISOL), C (ÁCIDO GRANDISÓICO) E D (LACTONA) AS ESTRUTURAS MOLECULARES DOS COMPOSTOS MACHO-ESPECÍFICOS IDENTIFICADOS.	49
FIGURA 15. EMISSÃO MÉDIA DO COMPOSTO MAJORITÁRIO, ÁCIDO GRANDISÓICO, DURANTE A ESCOTOFASE E FOTOFASE (N=3).....	50
FIGURA 16. RESULTADO DE BIOENSAIOS COM MACHOS DE <i>Conotrachelus humeropictus</i> TESTADOS EM OLFATÔMETRO DE TUBO EM Y, NOS SETE TRATAMENTOS. N=40 (* SIGNIFICATIVO).....	52
FIGURA 17. RESULTADO DE BIOENSAIOS COM FÊMEAS DE <i>Conotrachelus humeropictus</i> TESTADAS EM OLFATÔMETRO DE TUBO EM Y, NOS SETE TRATAMENTOS. N=30 (* SIGNIFICATIVO).....	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. <i>Theobroma cacao</i> (cacau) e <i>Theobroma grandifolium</i> (cupuaçu): plantas hospedeiras de <i>Conotrachelus humeropictus</i> e sua importância	13
1.1.1. A cultura do cacau (<i>Theobroma cacao</i>).....	13
1.1.2. A cultura do cupuaçu (<i>Theobroma grandifolium</i>).....	15
1.2. A broca-dos-frutos do cacau e do cupuaçu, <i>Conotrachelus humeropictus</i> (Coleoptera, Curculionidae).....	16
1.3. Métodos de controle de <i>Conotrachelus humeropictus</i> (Coleoptera: Curculionidae)	19
1.4. Ecologia química aplicada à agricultura	21
1.4.1. Comunicação química dos insetos.....	22
1.4.1.1. Feromônios.....	23
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo Geral.....	28
2.2. Objetivos Específicos.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Insetos.....	29
3.2. Coleta de Voláteis.....	30
3.3. Análises do perfil de voláteis de machos e fêmeas.....	31
3.3.1. Quantificação do composto majoritário.....	32
3.3.2. Quantificação por fotoperíodo.....	32
3.4. Identificação dos Compostos Feromonais.....	33
3.4.1. Reação de ciclização do ácido grandisóico.....	33
3.4.2. Microderivatização: Redução do ácido grandisóico para o grandisol.....	34
3.5. Atividade biológica de <i>C. humeropictus</i> mediante os compostos sintetizados.....	34
3.5.1. Bioensaios.....	35
3.5.2. Eletroantenografia (EAG).....	38
3.5.3. Teste de campo.....	39
3.6. Análises estatísticas.....	40
4. RESULTADOS	42
4.1. Análise e identificação dos compostos macho-específicos de <i>Conotrachelus humeropictus</i>	42
4.1.1. Composto A.....	43

4.1.2.	Composto B.....	45
4.1.3.	Composto C.....	46
4.1.4.	Composto D.....	47
4.2.	Avaliação da atividade biológica de <i>C. humeropictus</i> mediante os compostos sintetizados	49
4.2.1.	Quantificação.....	50
4.2.2.	Bioensaios.....	51
4.2.3.	Teste de atratividade em campo.....	52
5.	DISCUSSÃO.....	53
6.	CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	63

1. INTRODUÇÃO

A broca-do-fruto do cacau e cupuaçu, *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) é a principal praga destas frutíferas. O dano é ocasionado pela presença de larvas desse coleóptero que se desenvolvem durante este estágio dentro dos frutos. As larvas se alimentam de polpas e sementes formando galerias, os tornando, assim, impróprios para comercialização. Os frutos que apresentam as larvas são descartados, causando perdas severas de produtividade (MENDES, MAGALHAES & OHASHI, 1997; AGUILAR & GASPAROTTO, 1999; SOUZA *et al.*, 1999).

A principal importância econômica do cacau (*Theobroma cacao* Linnaeus) é a produção de chocolate sob as mais variadas formas em todo o mundo, e também pela utilização da manteiga de cacau nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (FURLAN, 2013).

O cultivo do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann) é visto como uma das mais importantes atividades agrícolas da região Amazônica do Brasil em função da grande aceitação no mercado interno e externo da polpa *in natura* ou processada (SAID, 2011).

Um dos fatores limitantes para a expansão da produção do cacau e cupuaçu está relacionado aos aspectos fitossanitários, como o ataque de fungos e pragas (LOPES & SILVA, 1998). O controle de pragas nessas culturas restringe-se, basicamente, à utilização de produtos químicos. No entanto, em virtude das limitações existentes ao uso de defensivos, formas alternativas que não agridem o ambiente são uma excelente opção para reduzir a quantidade de inseticidas aplicados nessas culturas (VILELA & MAFRA-NETO, 2001).

No Brasil, desde a década de 1990, a descoberta de diversos feromônios tem se mostrado promissora no manejo de insetos pragas para um grande número de culturas (BENTO, 2001). A utilização de feromônios é uma alternativa no manejo de insetos que atacam culturas e tem um papel fundamental para a redução significativa do uso de agrotóxicos. Além de não apresentarem nenhum perigo potencial para o meio ambiente, o seu emprego não tem resultado em desenvolvimento de resistência pelas pragas (VILELA & MAFRA-NETO, 2001).

Considerando os problemas causados pela broca-do-fruto (*C. humeropictus*) em culturas de cacau e cupuaçu, esta dissertação teve por objetivo identificar o feromônio emitido por este coleóptero e contribuir com conhecimentos sobre a ecologia química e o comportamento sexual dessa praga visando aprimorar seu manejo nessas culturas.

1.1. *Theobroma cacao* (cacau) e *Theobroma grandifolium* (cupuaçu): plantas hospedeiras de *Conotrachelus humeropictus* e sua importância

O gênero *Theobroma* (Malvaceae) compreende 22 espécies. Destas, dez ocorrem no Brasil, todas restritas à Bacia Amazônica (SILVA, VENTURIERI & FIGUEIRA, 2004). As espécies *Theobroma cacao* (cacau) (Figura 1 A) e *Theobroma grandifolium* (cupuaçu) (Figura 1 B) são as duas espécies mais importantes economicamente para o Brasil, dentro deste gênero (FRAIRE FILHO, s/d).



FIGURA 1. **A** - ÁRVORE DE CACAU (*Theobroma cacao*) **B** - ÁRVORE DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*).

1.1.1. A cultura do cacau (*Theobroma cacao*)

Dentro do gênero *Theobroma*, a espécie de maior importância econômica é *Theobroma cacao* Linnaeus, 1720 em função do interesse do mercado internacional pela produção de chocolate, feita a partir de suas amêndoas (CUATRECASAS, 1964).

O chocolate se constitui numa fonte de carboidratos, proteínas e gorduras. No entanto, seu consumo está associado às suas características organolépticas, pois são encontrados nos frutos de cacau e, conseqüentemente, no chocolate, estimulantes como teobromina, cafeína e teofilina (BAELO *et al.*, 2002). A teobromina é um alcaloide que tem o mesmo efeito estimulante da cafeína, porém em menor escala (ETENG *et al.*, 1997). Como remédio, a teobromina é utilizada por apresentar determinadas reações no corpo humano, estimulando a circulação sanguínea, a dilatação dos vasos e o aumento da produção de urina, além de relaxar músculos dos bronquíolos dos pulmões (ETENG *et al.*, 1997).

Apesar de *T. cacao* ser nativa da região tropical das Américas, a Costa do Marfim é o maior produtor mundial de sementes de cacau e o Brasil aparece em sexto lugar no *ranking* (FAOSTAT, 2012). A produção total de amêndoas, de acordo com os dados do Censo Agropecuário do IBGE (2006), foi de 199.172 toneladas, sendo produzida em 74.834 estabelecimentos, que ocupam 614.197 hectares de área plantada. Da produção total nacional, o estado da Bahia é o maior produtor de amêndoas de cacau, contribuindo com 78,1%, seguido pelo Pará, com 14,5% e, em terceiro lugar, Rondônia, com apenas 2,9%¹ (IBGE, 2006). Em comparação com indicadores mais recentes da produção agrícola nacional, publicados pelo próprio IBGE, relativos a setembro de 2013, a produção total passou para 262.849 toneladas, representando um aumento de 24,2%, em relação a 2006. De outro lado, a área ocupada pela cultura do cacau aumentou 11% neste mesmo período, passando a ocupar 677.906 hectares (IBGE, 2013).

Até o final da década de 1980, o Brasil era o segundo maior produtor de cacau do mundo. Porém, desde então, a lavoura cacauzeira vem atravessando uma

¹ Dados referentes aos estabelecimentos com mais de 50 pés de cacau.

crise, devido principalmente a problemas fitossanitários, em particular pelo ataque do fungo *Moniliophthora perniciosa*, conhecido como vassoura-de-bruxa, que afeta a qualidade e quantidade dos frutos produzidos (SENATORE & MUÑOZ, 2013). Para reverter este quadro e fazer com que o Brasil volte a ocupar uma posição de destaque no mercado internacional da produção de cacau são necessárias diversas medidas, tais como:

O acesso ao crédito e garantias de venda de produção, a construção de estruturas produtivas do processo de beneficiamento da amêndoa para produtores organizados em cooperativas, a recomposição do estande com mudas de procedência garantida e o consórcio com espécies de valor econômico (SENATORE & MUÑOZ, 2013, p. 26).

1.1.2. A cultura do cupuaçu (*Theobroma grandifolium*)

O cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Wildenow ex Sprengel) Schumann, 1886, é outra espécie do gênero com grande importância econômica para a região Amazônica, onde a planta é naturalmente encontrada nas florestas tropicais úmidas de terras altas, as quais não são inundadas pela cheia sazonal dos rios (SOUZA *et al.*, 1999). No Brasil, a espécie encontra-se disseminada por toda a Bacia Amazônica, em especial, nos estados do Pará, Acre, Rondônia, Amazonas e norte do Maranhão, além de em algumas regiões dos estados de São Paulo e Bahia (VENTURIERI, 1993).

A produção total de frutos colhidos, de acordo com os dados do Censo Agropecuário do IBGE (2006), foi de 3.026 toneladas, sendo produzida em 3.878 estabelecimentos. O Pará é o estado brasileiro que apresenta a maior produção de cupuaçu com 59,2% da produção nacional² (IBGE, 2006). Na América Latina e Caribe, o cultivo de cupuaçu também pode ser encontrado ocasionalmente na

² Dados referentes aos estabelecimentos com mais de 50 pés de cupuaçu.

Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana, Venezuela, Peru, Martinica, São Tomé e Trinidad Tobago (AGUILAR & GASPAROTTO, 1999).

Segundo Said (2011), o cupuaçu apresenta grande potencial para se destacar dentre os outros frutos amazônicos por ter uma característica importante aos olhos dos investidores econômicos: seu fruto pode ser aproveitado inteiramente em diversos setores produtivos, como no alimentício, cosmético e agropecuário. No setor de cosméticos, a semente do cupuaçu é prensada e dela é produzida a manteiga, rica em ômega-9 e foto-esteróis. As sementes podem ser utilizadas na produção de um chocolate alternativo, chamado cupulate. As cascas também podem ser aproveitadas como ração animal e adubo para reposição de nutrientes do solo, como potássio, ferro e manganês. Entretanto, utiliza-se em sua maioria apenas a polpa, a qual possui grande aceitação no mercado e larga escala de uso pela indústria alimentícia, com extensão no mercado nacional e internacional. Assim, subprodutos como sementes e cascas, que poderiam ser utilizados na produção de outros elementos, são descartados, o que provoca um enfraquecimento da cadeia de produção desta espécie.

1.2. A broca-dos-frutos do cacau e do cupuaçu, *Conotrachelus humeropictus* (Coleoptera, Curculionidae)

Dentre os insetos que oferecem risco de dano econômico às culturas do cacau e do cupuaçu, a espécie *Conotrachelus humeropictus* (Figura 2 A) é considerada a principal praga por provocar prejuízos severos durante todo o ano (THOMAZINI, 2002).

O dano principal de *C. humeropictus* é causado pelas larvas (Figura 2 B), que permanecem dentro dos frutos durante a fase imatura, que tem duração média de 26 dias. As larvas se alimentam de polpas e sementes formando galerias, tornando assim os frutos impróprios para comercialização (Figura 2 B) (THOMAZINI, 2002).

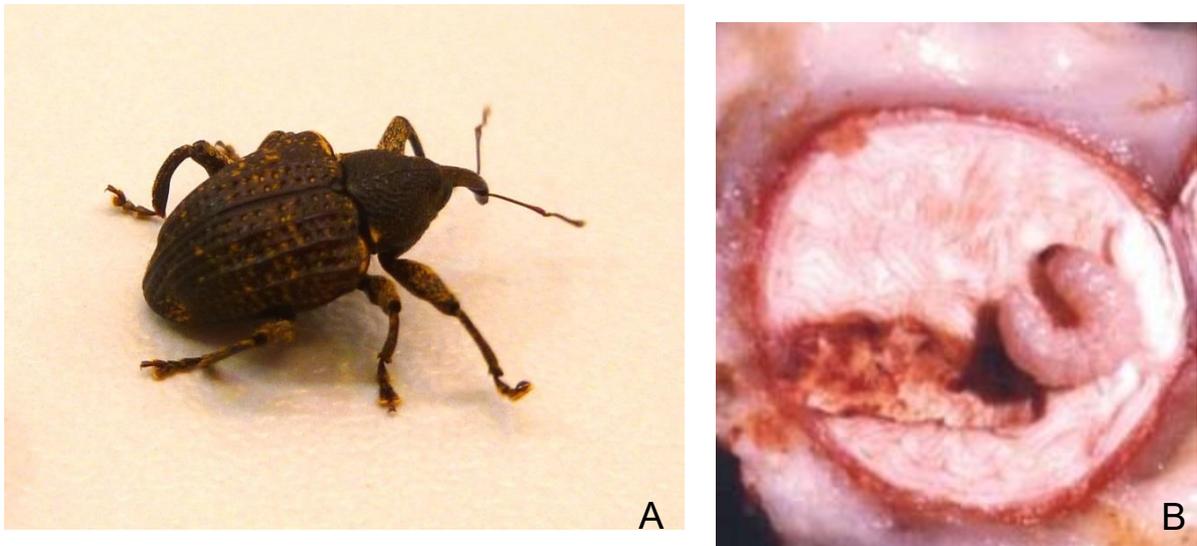


FIGURA 2. **A** - ADULTO DE *Conotrachelus humeropictus*. **B** - LARVA DE *Conotrachelus humeropictus* E O DANO REALIZADO EM UM FRUTO DE CUPUAÇU.

FORNE 2 A: O autor (2014); 2 B: SILVA & ALFAIA (2004)

Segundo Aguilar e Gasparotto (1999), um fruto atacado pode apresentar até 33 larvas. Quando frutos novos são atacados, caem ao solo antes de atingir o amadurecimento e então as larvas em estágio de pré-pupa saem do fruto e se dirigem ao solo para empupar, onde permanecem por uma média de 16 dias. No entanto, quando os frutos amadurecem ainda com a presença das larvas, microrganismos decompositores passam a agir, destruindo a polpa e prejudicando o desenvolvimento das larvas (AGUILAR & GASPAROTTO, 1999).

Segundo Mendes, Garcia e Trevisan (1982), o primeiro registro da broca-do-fruto foi feito em 1981, atacando frutos de cacau em Rondônia. Ocorrências foram

registradas também em frutos silvestres como cacauí, *T. speciosum* e cacaarana, *T. microcarpum* (THOMAZINI, 2002). Essa colebroca está disseminada em regiões onde as condições climáticas são adequadas ao seu desenvolvimento, com médias de temperatura variando entre 21,6 e 27,5 °C, umidade variando de 64% a 93% e precipitação anual entre 1.900mm e 3.100mm (AGUILAR & GASPAROTTO, 1999).

As fêmeas da broca depositam seus ovos no interior dos frutos através de furos feitos na casca (THOMAZINI, 1998; LOPES, 2000; OLIVEIRA, 2003). Assim, após a eclosão dos ovos, inicia-se o dano direto causado pelas larvas ao penetrar no endocarpo. Alimentando-se da polpa e semente, as larvas constroem galerias dentro do fruto até atingir seu estágio larval mais avançado quando fazem um orifício de saída na casca do fruto e se dirigem ao solo para empupar (SILVA & ALFAIA, 2004). Este orifício pode ser local de entrada de patógenos, consequência indireta das larvas de *C. humeropictus*. Já os adultos se alimentam de folhas e frutos novos, porém causando apenas dano indireto (THOMAZINI, 2002).

Os prejuízos causados pela presença de larvas de *C. humeropictus* em frutos de cacau e cupuaçu podem chegar a 50% da produção, o que foi constatado em diversas propriedades (LOPES & SILVA, 1998; OLIVEIRA, 1998; LAKER & TREVISAN, 1992). Em cultivos de cupuaçu, normalmente são utilizados sistemas semi-extrativistas, sem tomar cuidado com os problemas fitossanitários (AGUILAR & GASPAROTTO, 1999). Nestes casos, quando não há medidas básicas de controle, a perda da produção pode chegar a 100% (AGUILAR & GASPAROTTO, 1999). Não há estudos recentes sobre perdas na produtividade relacionadas à presença da broca-do-fruto.

Apesar da broca-dos-frutos do cacau e do cupuaçu pertencer à mesma espécie, alguns autores sugerem se tratar de espécies diferentes por apresentarem

algumas diferenciações biológicas, como a duração da fase de pupa (AGUILAR & GASPAROTO, 1999). De acordo com um estudo genético que utilizou um gene mitocondrial (COI) de exemplares coletados em cacau e em cupuaçu, a taxa máxima de variabilidade genética encontrada foi de 3% entre eles (MOURA, FIRMINO & ITOYAMA, 2013). Esta taxa pode ser considerada relativamente alta por se tratar de uma sequência tão pequena de nucleotídeos. Porém, considerando o COI um gene bem conservado entre as espécies, apenas com base nas análises de sequências deste único gene não foi possível concluir se os indivíduos pertencentes às duas populações são ou não espécies diferentes (MOURA, FIRMINO & ITOYAMA, 2013).

1.3. Métodos de controle de *Conotrachelus humeropictus* (Coleoptera: Curculionidae)

O controle da broca-do-fruto restringe-se basicamente à utilização de inseticidas organofosforados (como endosulfan, metamidofós, metil paration e fention), os quais interferem no sistema nervoso levando à morte do inseto (SANTOS *et al.*, 2007). Estes inseticidas são pouco eficientes e antieconômicos, principalmente pelo número exagerado de aplicações, eliminando juntamente a fauna benéfica (GALLO *et al.*, 1988; MENDES & GARCIA, 1989; AGUILAR & GASPAROTTO, 1999). Para controlar insetos-praga da família Curculionidae são utilizados inseticidas, os quais não tem se mostrado eficientes no controle, principalmente, porque a maioria destes passa a parte larval dentro do tecido vegetal do hospedeiro, como é o caso de *C. humeropictus*. Nestes casos, a utilização de feromônio se mostra uma técnica promissora dentro do Manejo Integrado de Pragas (MIP) (VILELA & MAFRA-NETO, 2001; AMBROGI *et al.*, 2009).

A dificuldade de controle aumenta ainda mais pelo fato de os ovos e as larvas serem encontrados no interior dos frutos (THOMAZINI, 2002). Além do mais, por apresentarem hábito noturno, provavelmente os adultos estejam escondidos durante o dia, ou seja, durante a pulverização, dificultando o controle (AGUILAR & GASPAROTTO, 1999).

Para a redução da incidência da broca-do-fruto através de controle cultural recomendam-se diversas medidas como: evitar incluir nos Sistemas Agroflorestais (SAF) outras plantas que possam sombrear as árvores de cacau e cupuaçu, evitar que estas culturas sejam alternadas nos SAFs, fazer a quebra dos frutos longe da área de cultivo, colher os frutos brocados, preferencialmente pela manhã, após a colheita queimar ou enterrar os frutos em valas profundas (TREVISAN, 1989; SOUZA *et al.*, 1999; SILVA & ALFAIA, 2004).

O controle cultural apresenta-se como uma medida preventiva, mantendo áreas livres da presença da broca-do-fruto, porém não sendo eficiente, em curto prazo, na redução populacional de áreas infestadas (TAVARES & NUNES, 2002).

A busca por novos métodos de controle para minimizar a dispersão e o ataque desses insetos à cultura, além da preocupação de desenvolver técnicas de controle que não agridam o ambiente, vem mobilizando pesquisadores a desenvolverem técnicas alternativas de controle. Assim, investimentos em pesquisas que busquem novas tecnologias estão crescendo, visando minimizar os riscos dos defensivos agrícolas (PINTO-ZEVALLOS & ZARBIN, 2013).

Segundo a definição da FAO, o Manejo Integrado de Pragas (MIP) reúne diversas formas de controle, como cultural, químico, etológico, biológico e associa o ambiente à dinâmica populacional da espécie, visando manter a população do inseto-praga controlada abaixo do nível de dano (Stern *et al.*, 1959). O aumento

populacional da fauna benéfica é utilizado amplamente no controle biológico de uma forma planejada e harmoniosa para controlar populações de insetos-praga. Diversos trabalhos publicados demonstram a possibilidade de utilização de patógenos e parasitoides no controle de *C. humeropictus*.

Lopes (2000) encontrou os gêneros *Lixophaga* sp. (Diptera: Tachinidae) e *Urosigalphus* sp. (Hymenoptera: Braconidae) parasitando as larvas de *C. humeropictus* e concluiu que poderiam ser utilizados como uma forma de controle.

O nematóide *Sterneinema carpocapsae* foi analisado como um entomopatógeno potencial para controlar *C. humeropictus*, visto que este passa a fase de pré-pupa e pupa no solo (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Mendes e colaboradores (2001) compararam e avaliaram a eficiência dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Bauveria bassiana*, que já haviam sido encontrados infectando larvas e adultos de *C. humeropictus*, e constataram que *B. bassiana* apresentou maior mortalidade de larvas (52%), podendo ser utilizado no controle da broca.

1.4. Ecologia química aplicada à agricultura

A ecologia química é uma área recente e multidisciplinar que estuda a interação entre organismos e outros organismos e seu ambiente, considerando moléculas químicas como mediadores destas interações, revelando uma área recente no contexto científico. No âmbito entomológico, a ecologia química surge como uma nova ciência que tem o objetivo de garantir a produção alimentícia sem agredir o meio e equilibrando o ambiente com a presença da entomofauna benéfica de predadores e parasitoides (PINTO-ZEVALLOS & ZARBIN, 2013).

A utilização de feromônios produzidos por insetos e aplicados às culturas, surge como alternativa no controle de insetos-praga de diversos cultivos. Após a identificação dos compostos feromonais, a atividade biológica destes compostos em relação ao inseto é comprovada através de bioensaios. Os bioensaios são experimentos que permitem determinar o papel destas substâncias em um contexto biológico, ecológico e/ou evolutivo (TRIGO *et al.*, 2000). Posteriormente podem ser sintetizados e utilizados em campo como controle de pragas, por meio da comunicação intraespecífica (TRIGO *et al.*, 2000).

1.4.1. Comunicação química dos insetos

No processo de comunicação os insetos utilizam estímulos mecânicos (sensilas tricóides, proprioceptores, timpânica e vibracional), estímulos térmicos (através de termorreceptores) e químicos (por quimiorreceptores) (GULLAN & CRANSTON, 2012). Entre esses estímulos, os químicos são essenciais para que insetos possam desenvolver funções vitais como: localização de alimento, percepção do ambiente, encontro do parceiro para cópula, defesa contra predadores e encontro do local ideal para de oviposição (VILELA & DELLA LUCIA, 2001).

Os semioquímicos (do grego *semeîon* = sinal), também chamados de infoquímicos, são substâncias químicas produzidas por um organismo e percebidas por outros através de sensilas olfativas. Esta percepção ocasiona uma resposta comportamental ou fisiológica no organismo, a qual pode ser vantajosa ou desvantajosa, ocorrendo, assim, a comunicação.

Esta comunicação pode ocorrer entre indivíduos da mesma espécie (comunicação intraespecífica) ou entre indivíduos de espécies diferentes

(comunicação interespecífica). A comunicação interespecífica é mediada por aleloquímicos, os quais podem ser classificados em: alomônios, cairomônios e sinomônios. Os semioquímicos são chamados de alomônios quando oferece vantagem apenas ao organismo que os emitem. Em contrapartida, os cairomônios são aqueles que oferecem vantagem ao organismo que os percebem. Sinomônios são aqueles que são favoráveis tanto ao indivíduo que libera quanto ao que percebe. Quando a comunicação ocorre entre indivíduos da mesma espécie, são chamados feromônios (TRIGO *et al.*, 2000).

1.4.1.1. Feromônios

A origem etimológica do termo feromônio deriva do grego, em que *pherein* significa transmitir e *horman* estimular, ou seja, um sinal químico produzido que, quando transmitido, desencadeia um estímulo em outro indivíduo da mesma espécie (LEAL, 2013).

O primeiro feromônio identificado foi o de *Bombyx mori* Linnaeus, 1758, bicho-da-seda, em 1959, sendo a estrutura um álcool primário de cadeia longa (BUTENANDT *et al.*, 1959). Desde então, diversas estruturas moleculares foram identificadas para várias espécies.

Os feromônios são classificados de acordo com a resposta desencadeada em outros organismos. Por exemplo: no encontro de parceiros para cópula, o feromônio é sexual; o feromônio de trilha é produzido para que os outros indivíduos da mesma espécie encontrem o caminho ou trilha percorrida; o feromônio de alarme tem a finalidade de alertar a presença de um predador. Este meio de comunicação

pode ser fundamental para o desenvolvimento de diversas funções vitais (VILELA & DELLA LUCIA, 2001).

Uma vez identificado o feromônio de uma espécie, são realizados testes de atratividade em campo e em laboratório. Para que estes simulem com maior fidelidade a emissão de feromônio por um inseto é necessário conhecer os hábitos da espécie, em qual fase do dia (clara ou escura) ocorre a emissão, a quantidade destes compostos e a proporção entre eles. A eletroantenografia é uma técnica complementar para estudar o reconhecimento dos compostos pelo inseto através da antena, entretanto, não é possível saber o papel destes compostos na atividade do inseto (THOMAZINI, 2009). Após comprovada a eficiência na atratividade o feromônio pode ser utilizado de forma sintética como um instrumento de manejo de insetos-praga na agricultura. Essa ferramenta surge como uma forma de controle alternativo, podendo ser utilizada no monitoramento, coleta massal e confusão sexual do inseto (ZARBIN, 2001). As formas de controle utilizando feromônio são as seguintes:

A fim de monitorar a espécie em uma determinada área, utiliza-se a atração através de armadilhas com feromônio, auxiliando o produtor na tomada de decisão sobre o manejo adequado. Armadilhas também podem ser instaladas para captura massal, quando o objetivo é a efetiva redução populacional, na qual uma armadilha contendo inseticida. Outra técnica é a de confusão sexual, com a qual são instalados em vários pontos, liberadores com feromônio sexual com a finalidade de saturar o ambiente. Assim, os casais não se encontram e a cópula não ocorre, diminuindo gradativamente a população.

A utilização de feromônio de agregação aplicado na agricultura tem contribuído para o controle de diversas espécies de brocas pertencentes à família

Curculionidae. No controle destas, tem se mostrado mais eficiente que métodos tradicionais de controle químico, sendo utilizado através da técnica de captura massal (OEHLSCHLAGER, 1993; AMBROGI *et al.*, 2009).

As estruturas moleculares dos feromônios apresentam uma diversidade de características que as diferenciam entre si, tais como sua volatilidade e estabilidade, sendo estas características fundamentais para o sucesso da comunicação. No caso do feromônio de trilha, as estruturas moleculares devem ser estáveis e pouco voláteis, de maneira que tenham maior durabilidade no ambiente. Em contrapartida, um feromônio de alarme, deve ter baixo peso molecular, sendo altamente volátil, para provocar uma rápida resposta em função da presença de uma ameaça externa (THOMAZINI, 2009).

Sendo o feromônio constituído por moléculas simples ou complexas, os insetos fitófagos normalmente sequestram essas moléculas do alimento e as utilizam para sua comunicação ou então adquirem do alimento estruturas primordiais para a síntese da molécula final do feromônio (REDDY & GUERRERO, 2004). Assim, sem o alimento, há um desfalque na produção do feromônio, sendo que em alguns casos, como ocorre com a mariposa *Helicoverpa zea* Boddie, 1850 (Lepidoptera: Noctuidae), quando desprovidas da planta hospedeira, não apresentaram atividade reprodutiva, nem mesmo a produção de feromônio (RAINA, KINGAN & MATTOO, 1992; AMBROGI & ZARBIN, 2008).

Em outros casos, moléculas ingeridas na fase larval são armazenadas e ao atingir a fase reprodutiva são utilizadas como precursores de feromônios sexuais e interação durante a corte, podendo ser chamados farmacófagos; como é o caso de *Archips semiferrana*, a lagarta enroladeira de folhas de carvalho (HENDRY, WICHMANN & HINDENLANG, 1975). No caso de armazenamento durante a fase

larval, é evolutivamente vantajoso para os lepidópteros, uma vez que durante a fase adulta sua função é reproduzir e deve se alimentar pouco (CERUTI, 2007; HENDRY, WICHMANN & HINDENLANG, 1975).

O feromônio é constituído normalmente por uma mistura de compostos químicos produzidos por apenas um dos sexos (SEYBOLD & VANDERWEL, 2003) e reconhecida como tal apenas por indivíduos da mesma espécie. Essa especificidade no reconhecimento do feromônio ocorre de maneira que duas espécies podem produzir os mesmos compostos, porém em proporções diferentes. Neste caso, a espécie apenas reconhece seu feromônio na devida proporção a qual é liberada pela sua espécie, não respondendo da mesma maneira quando a proporção varia, no caso de ser liberado por outras espécies (THOMAZINI, 2009). Esta especificidade também pode ser determinada pela configuração absoluta da molécula, ou seja, se uma molécula tem um centro quiral, a mesma molécula pode apresentar dois isômeros diferentes, podendo ser um dos isômeros produzido e reconhecido por uma espécie, e o outro isômero, produzido e reconhecido apenas por outra espécie (THOMAZINI, 2009). A Figura 3 representa um exemplo de molécula quiral, com apenas um centro quiral.

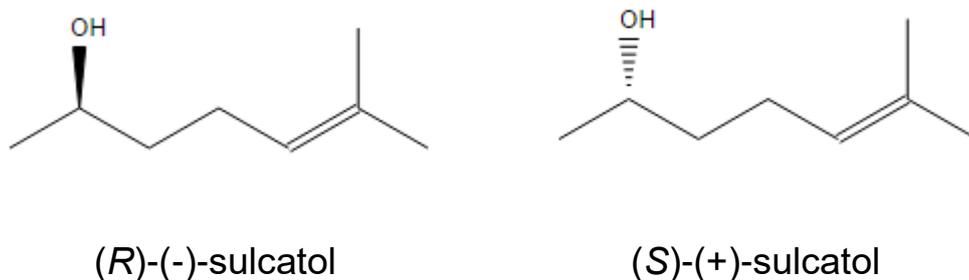


FIGURA 3. EXEMPLO DE ESTRUTURAS QUIRAIS: MOLÉCULA DE SULCATOL, FEROMÔNIO DE *Gnathotrichus materiarius* E *G. sulcatus*.

Por apresentar tamanha especificidade, a utilização de feromônios nas práticas da produção agrícola auxilia no controle de determinados insetos-praga. O emprego de feromônio no controle de insetos presentes em altos níveis populacionais é bem sucedido para diversas espécies, como *Spodoptera frugiperda* Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae), *Cydia pomonella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Tortricidae), *Grapholita molesta* Busck, 1916 (Lepidoptera: Tortricidae) e *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae), dos quais são comercializados atrativos sintéticos para utilização no campo. Desta forma, utiliza-se de uma técnica que não agride o ambiente para controlar a superpopulação de determinadas espécies, permitindo, assim, que de uma forma mais natural o equilíbrio ambiental da entomofauna se restabeleça no meio (ZARBIN & RODRIGUES, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar o sistema de comunicação química da broca do cacau e do cupuaçu, visando contribuir com conhecimentos para o manejo de *Conotrachelus humeropictus* nas duas culturas.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar e analisar compostos voláteis sexo-específicos.
- Determinar o horário de emissão do feromônio e quantificar o composto majoritário durante o fotoperíodo (fotofase/ escotofase).
- Testar armadilhas de captura em ensaios de campo com os componentes identificados da mistura feromonal
- Conhecer a atratividade dos compostos identificados, isolados e em diferentes misturas, em condições laboratoriais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Insetos

Os insetos utilizados nos experimentos em laboratório foram coletados em plantações de cacau e cupuaçu nos anos de 2013 e 2014 em colaboração com a CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), no município de Arquimedes, localizado na região Centro-Norte do estado de Rondônia, na Amazônia brasileira. Para a coleta, utilizou-se o método do sacolejo, descrito por Trevisan (1989), no qual uma tela é alocada na projeção da copa da árvore que é, em seguida, sacodida. Em função dos insetos apresentarem comportamento de tanatose quando se sentem ameaçados, eles são coletados no momento em que se jogam ao chão fingindo-se de mortos.

Após a coleta, os insetos foram enviados à Universidade Federal do Paraná e mantidos no Laboratório de Semioquímicos, Departamento de Química, em caixas plásticas do tipo gerbox (11 x 11 x 3,5 cm), em grupos de no máximo 15 insetos, separados por sexo.

A separação dos sexos foi feita com base em diferenças no último segmento abdominal. Os insetos machos apresentam seis segmentos abdominais e, no último segmento, há uma depressão na área central (Figura 4 A). As fêmeas, no entanto, apresentam cinco segmentos e, no último, além de uma depressão central, encontram-se duas depressões laterais (Figura 4 B) (SILVA & ALFAIA, 2004).

Como fonte de alimento foi fornecido um pedaço de cana-de-açúcar fresco (OLIVEIRA, 1998), sendo este substituído a cada semana ou mesmo antes, se

necessário. Para manter a umidade no ambiente, um pedaço de algodão umedecido foi depositado em cada caixa.

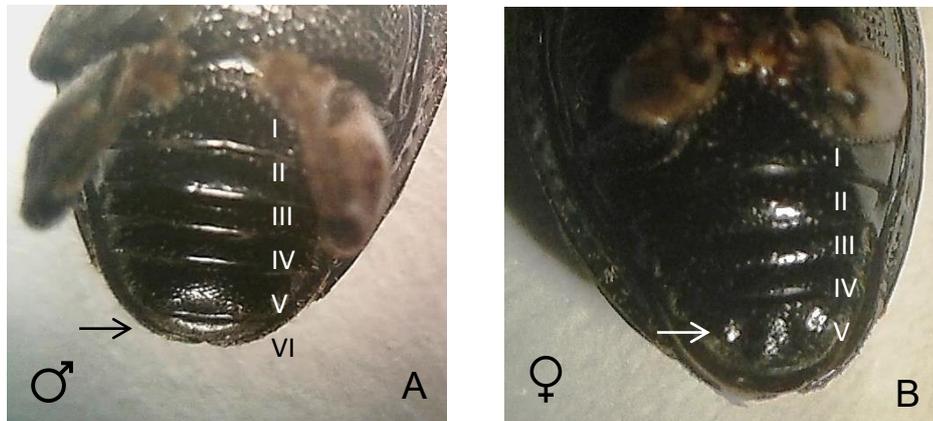


FIGURA 4. DIMORFISMO SEXUAL DE *Conotrachelus humeropictus*, BASEADO NA DIFERENCIAÇÃO DOS SEGMENTOS ABDOMINAIS ENTRE MACHOS (A) (SETA INDICANDO O 6º SEGMENTO ABDOMINAL PRESENTE APENAS NOS MACHOS) E FÊMEAS (B) (SETA INDICANDO O 5º SEGMENTO ABDOMINAL DAS FÊMEAS).

FONTE: O autor (2014)

3.2. Coleta de Voláteis

Os voláteis foram obtidos no Laboratório de Semioquímicos utilizando-se um sistema de aeração que consiste em um fluxo de ar contínuo, umidificado e filtrado em carvão ativo, que atravessa uma câmara de vidro (37 x 4 cm) e carrega consigo os compostos emitidos pelos insetos e pela fonte alimentar até a extremidade oposta da câmara, na qual está alocada uma coluna contendo polímero adsorvente (20mg – HayeSep) (Figura 5 A).

As coletas de voláteis foram realizadas em sala climatizada (T: 25 ± 2 °C) com fotoperíodo 12L:12E. Para coletar os voláteis, grupos de seis indivíduos separados por sexo foram mantidos em câmaras de aeração juntamente com pedaços de cana-de-açúcar (aproximadamente 10 cm de comprimento do colmo repartido ao meio) como fonte alimentar, sendo o fluxo de ar de 1L/min/câmara.

Após um período determinado de 12, 24 ou 48 horas, 400 μL de solvente (hexano bidestilado) foram utilizados para a dessorção dos compostos fixados em cada coluna, formando, assim, extratos de machos e fêmeas (Figura 5 B). Estes extratos foram mantidos em frascos de vidro com capacidade máxima de 2 mL, vedados, identificados (Figura 5 B) e, posteriormente, concentrados para 60 μL (10 μl /inseto), utilizando fluxo mínimo de ar comprimido filtrado com carvão ativo.

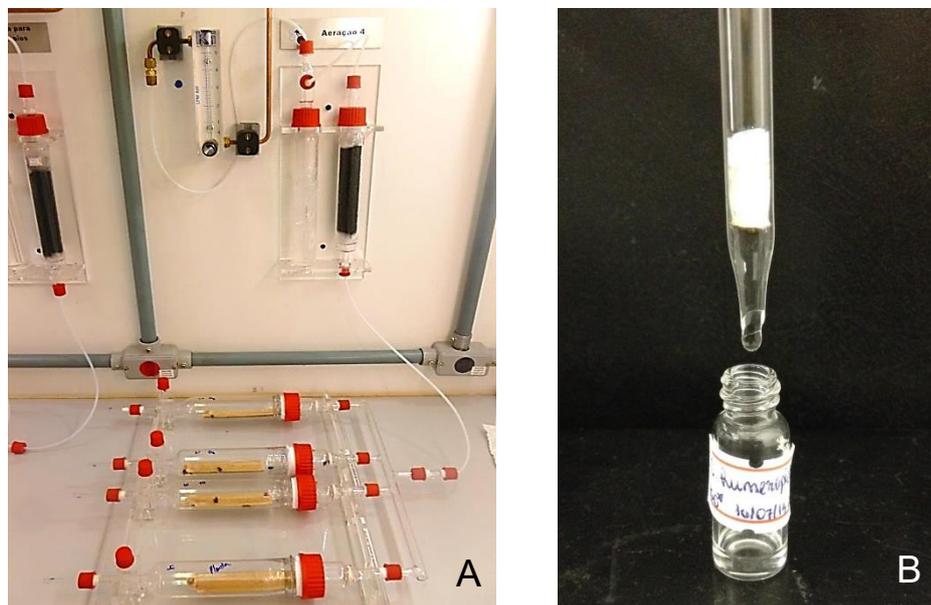


FIGURA 5. **A.** SISTEMA DE AERAÇÃO DE MACHOS E FÊMEAS SEPARADOS, JUNTAMENTE COM CANA-DE-AÇÚCAR COMO FONTE ALIMENTAR. **B.** PROCESSO DE DESSORÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS: (ACIMA) COLUNA COM POLÍMERO ADSORVENTE (ABAIXO) O EXTRATO FORMADO.

FONTE: O autor (2014)

3.3. Análises do perfil de voláteis de machos e fêmeas

O perfil de voláteis de machos e fêmeas foi analisado usando uma alíquota de 1 μL de cada extrato em cromatografia gasosa (CG) (GC-2010 - Shimadzu) e, através da comparação dos cromatogramas de machos e fêmeas, para detectar compostos sexo-específicos. Após a detecção de compostos sexo-específicos, os extratos foram analisados em equipamento de cromatografia gasosa acoplado a

espectrômetro de massas (CG-MS) (GC-MS-QP 2010 Plus - Shimadzu). Para tal, foi utilizado o método splitless e injetor com temperatura de 250 °C. A temperatura da coluna foi mantida em 50 °C por 1 minuto e elevada até 250 °C, com taxa de 7 °C min⁻¹ e mantida por 10 minutos. Foi utilizada a coluna RTX-5 (30m x 0,25mm i.d. e 0,25 µm de espessura de filme; Restek, Bellefonte, Pennsylvania, USA) nos equipamentos de CG e CG-MS. Hélio foi empregado como gás de arraste e na coluna a pressão utilizada foi de 170 kPa.

3.3.1. Quantificação do composto majoritário

Para determinar a quantidade diária do composto majoritário emitido por machos de *C. humeropictus*, foram coletados extratos de aerações de seis machos durante 24 horas. Para a quantificação deste composto, foi utilizado um padrão do hidrocarboneto tetradecano (C14) cuja área conhecida foi comparada com as áreas do composto majoritário sexo-específicos presente nos extratos. Além disso, uma curva analítica foi realizada utilizando o ácido grandisóico como padrão externo em concentrações de 10, 25, 50, 75 µg.mL⁻¹.

3.3.2. Quantificação por fotoperíodo

O período de maior liberação do feromônio foi constatado através de quantificações de extratos de aerações de seis machos de *C. humeropictus* durante o fotoperíodo (12L:12E). A quantificação foi realizada com base no composto majoritário. O padrão interno tetradecano (C14) em uma concentração de 25 ppm foi utilizado para comparação de áreas.

3.4. Identificação dos Compostos Feromonais

Os compostos presentes na mistura feromonal foram identificados através de análises comparativas de espectros de massas, juntamente com coinjeções de padrões sintéticos. O Índice de Kovats dos compostos foi calculado utilizando uma série de hidrocarbonetos saturados (C10-C26) através de coinjeções com as amostras em GC.

As propostas estruturais iniciais dos compostos feromonais de *C. humeripictus* foram baseadas em análises de espectros de massas de cada composto, comparando os padrões de fragmentação com padrões de compostos sintéticos.

Padrões sintéticos do ácido grandisóico, \pm -grandisol e 1*R*,2*S*(+)-grandisol, foram cedidos pelo Prof. Kenji Mori, da Universidade de Tóquio, Japão. A lactona (composto **D**) foi sintetizada em laboratório conforme metodologia descrita abaixo.

3.4.1. Reação de ciclização do ácido grandisóico

Para comprovar a estrutura molecular do composto **D** foi realizada a reação de ciclização do ácido grandisóico. O produto da reação foi então comparado com o extrato natural. Para esta reação foi realizado o seguinte procedimento:

Em um *vial*, contendo 20 mg de ácido grandisóico e 100 μ L de metanol, foi adicionado 50 μ L de HBr 48%. A solução foi mantida em temperatura ambiente por uma hora em agitação magnética. Posteriormente, 100 μ L de solução saturada de NaHCO₃ foi adicionada e depois a mistura foi extraída com hexano. As camadas orgânicas foram secas usando MgSO₄ anidro e, então, o solvente foi removido.

3.4.2. Microderivatização: Redução do ácido grandisóico para o grandisol

Para determinar a configuração absoluta do ácido grandisóico, uma amostra do extrato natural contendo o ácido foi reduzida para o álcool grandisol. Esta amostra reduzida foi então comparada com amostras de padrão sintético de grandisol, por haver disponível apenas amostra de isômero de grandisol. Para isso, empregou-se o seguinte procedimento:

Foi diluído 30 μL de um extrato natural (proveniente de aeração de seis machos) em 30 μL de éter etílico e, posteriormente, foi adicionado 30 μL de uma suspensão de LiAlH_4 (1 mg em 100 μL de éter etílico) em temperatura ambiente. Após cinco minutos, foi adicionado 50 μL de uma solução saturada de NH_4Cl . Posteriormente, a fase aquosa foi extraída com duas porções de éter etílico. Depois de filtrada, a amostra foi analisada em GC-MS.

Para a determinação da configuração absoluta das moléculas, as análises de quiralidade dos compostos foram realizadas em GC equipado com coluna de fase estacionária quiral (β -ciclodextrina) em uma isoterma a 110 $^\circ\text{C}$.

3.5. Atividade biológica de *C. humeropictus* mediante os compostos sintetizados

Os compostos identificados foram testados em laboratório de duas formas: bioensaios, utilizando um olfatômetro de dupla escolha tipo “Y” e a técnica de eletroantenografia, empregando um equipamento eletroantegráfico acoplado a um cromatógrafo em fase gasosa.

Os compostos sintetizados foram testados também em campo, utilizando-os como atrativos em armadilhas tipo BW fabricadas pela ISCA Technologies, Inc..

3.5.1. Bioensaios

Para testar a atratividade de machos e fêmeas em laboratório aos compostos macho-específicos foi utilizado um olfatômetro em “Y” de vidro (30 x 2 cm) (Figura 6). Neste sistema, um fluxo contínuo de ar umidificado e filtrado em carvão ativo atravessa os dois braços do tubo até a extremidade oposta (Sentido **B** e **C** para **A**). No lado oposto, um inseto foi colocado na extremidade **A**. O inseto testado deve dirigir-se até a extremidade de um dos braços do olfatômetro para ser computada a escolha. Em um dos braços do olfatômetro (**B** ou **C**) é colocado um dos tratamentos em um pedaço de papel filtro (0,5 x 1 cm) e no outro o controle (hexano). Os testes foram realizados durante o período de maior liberação do feromônio, usando o olfatômetro em posição horizontal, sendo invertida a posição a cada cinco repetições para evitar erro de preferência. O tubo em Y foi lavado após cada bioensaio para evitar resíduos e possíveis erros em testes seguintes. O tempo máximo delimitado de observação foi de 10 minutos para cada indivíduo.

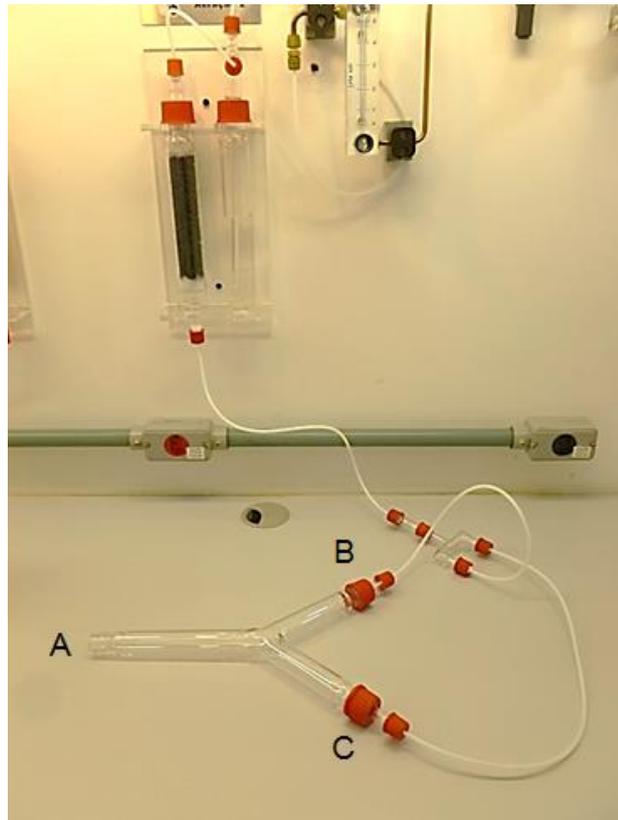


FIGURA 6. OLFATÔMETRO TIPO “Y” UTILIZADO PARA TESTAR ATRATIVIDADE DOS INSETOS AOS COMPOSTOS SINTÉTICOS IDENTIFICADOS DA SUA MISTURA FEROMONAL DE *Conotrachelus humeropictus*.

Fonte: O autor (2014)

Para testar a propagação dos compostos dentro do tubo, realizou-se uma simulação com a produção de uma pluma de fumaça através de uma mistura de ácido clorídrico e hidróxido de amônio (BAKER & LINN, 1984). O fluxo de ar determinado foi de 1,5 L/min.

Após a identificação do período de maior emissão de voláteis foram realizados testes de atratividade, inicialmente em laboratório, utilizando um olfatômetro de tubo em “Y”, sendo experimentados os compostos sintetizados. Posteriormente, os testes foram feitos em campo.

Os bioensaios foram realizados no período de maior atividade dos insetos, em sala climatizada com umidificador e aquecedor para simular um ambiente quente

e úmido (UR: 70 ± 5 % e T: 27 ± 2 °C), mais próximo às condições climáticas encontradas na região de origem de *C. humeropictus*.

Os compostos macho-específicos identificados foram testados de forma isolados e combinados entre si contra o controle, totalizando sete tratamentos, sendo testados 40 machos e 40 fêmeas para cada tratamento. Os compostos **A**, **C** e **D** foram utilizados nos testes, na forma sintética, com concentrações de 50, 100 e 1 ppm, respectivamente. Estes extratos sintéticos testados continham os compostos na forma racêmica. No mesmo papel filtro dos tratamentos e do controle foi adicionado um extrato contendo os voláteis provenientes de aeração (48 h – 100 µL) da fonte alimentar (cana-de-açúcar). Os tratamentos testados foram os seguintes:

Ext. F.A. + Gsol x Ext. F.A.

Ext. F.A. + AG x Ext. F.A.

Ext. F.A. + Lac x Ext. F.A.

Ext. F.A. + Gsol + AG x Ext. F.A.

Ext. F.A. + Gsol + Lac x Ext. F.A.

Ext. F.A. + AG + Lac x Ext. F.A.

Ext. F.A. + Gsol + AG + Lac x Ext. F.A.

[Composto **A**, Grandisol (Gsol); Composto **C**, Ácido grandisóico (AG) e Composto **D**, Lactona (Lac), Extrato da fonte alimentar (Ext. F.A.)].

Para cada tratamento, 3 µL de solução foram impregnados em papel filtro de dimensões 1 x 0,5 cm. Foi adicionada a mesma quantidade de extrato de voláteis de cana-de-açúcar. Para o controle, foram adicionados 3 µL de voláteis de cana-de-açúcar e 3 µL de hexano, o mesmo solvente utilizado nas soluções dos compostos

sintetizados. Para isso foi utilizada uma microseringa Hamilton com volume máximo de 10 μL .

3.5.2. Eletroantenografia (EAG)

A eletroantenografia é uma técnica complementar para estudar a atividade de *C. humeropictus* mediante os compostos. Os compostos foram analisados utilizando um cromatógrafo em fase gasosa (GC) Shimadzu GC-2010 acoplado a um equipamento eletroantegráfico Syntech (Hilversum, Holanda). O GC estava equipado com uma coluna RTX-5 (30 m x 0,25 mm d.i. e 0,25 μm de espessura de filme; J&W Scientific Inc., EUA). Foi analisada uma alíquota de 1 μL de cada amostra padrão empregando o modo splitless com a temperatura do injetor a 250 $^{\circ}\text{C}$. A temperatura do forno foi mantida a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, aumentada para 250 $^{\circ}\text{C}$ em uma velocidade de 7 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sendo mantida nesta temperatura por 10 min. Hélio foi usado como gás carregador e a pressão na coluna foi de 170 kPa. O efluente da coluna foi dividido em uma razão 3:1 com três partes indo para a linha de transferência aquecida e com uma corrente de ar umidificado seguindo diretamente para a antena, e uma parte indo para o detector de ionização em chama (FID). A antena foi fixada entre dois eletrodos de aço inox usando gel condutor (Signa gel, Parker Labs., EUA).

Foram testadas antenas de machos e fêmeas para os compostos grandisol ácido grandisóico e lactona em concentrações de 50, 100 e 1 ppm, respectivamente. Estes extratos sintéticos testados continham os compostos na forma racêmica. Os eletroantogramas do sistema de eletroantenografia acoplado ao cromatógrafo em fase gasosa foram visualizados com o programa Syntech GC-EAD32 (versão 4.6).

3.5.3. Teste de campo

Foi realizado um teste de campo para avaliar a atratividade de *C. humeropictus* para dois dos três compostos identificados. O teste foi realizado em agosto de 2014, na estação experimental da CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), localizada às margens da BR 364, no município de Ouro Preto do Oeste em Rondônia, latitude 10°44'30"S e longitude 62°13'30"W.

Para os testes de atração das iscas sete árvores de cacau foram teladas. As árvores com idade uniforme de 15 anos e com altura aproximada de 3 metros foram totalmente isoladas em uma gaiola com armação de madeira de 12 cm de largura e tela sintética tipo sombrite de 18% de sombreamento (Figura 7 A). Em cada árvore foram colocados 120 insetos capturados no campo, na proporção de 60 machos e 60 fêmeas por árvore. Os insetos foram colocados nas árvores 24 horas antes da disponibilização da armadilha.

As armadilhas utilizadas foram do tipo BW fabricada pela empresa ISCA Technologies, Inc., as quais são utilizadas para a captura de bicudo do algodoeiro, *Anthrenus grandis*. As armadilhas contendo uma isca de cada tratamento foram afixadas com auxílio de uma vara de madeira de 1,54 metros dentro das gaiolas onde anteriormente foram colocados os insetos (Figura 7 B). Após 24, 48 e 72 horas foram realizadas vistorias para constatação de captura.

Os tratamentos foram feitos com base em dois compostos: o ácido grandisóico (GA – composto **C**) e a lactona (Lac – composto **D**). Para todos os tratamentos, também foi depositado, como isca alimentar, um pedaço de fruto de cacau. Na armadilha controle foi fornecido apenas um pedaço de fruto de cacau.

Nas iscas foram impregnados os compostos sintéticos na forma racêmica. As iscas foram mantidas em refrigerador ($T: 5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) até a sua utilização em campo.

Os compostos sintéticos foram impregnados em difusor, de material semelhante a um tecido de feltro, de formato circular de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro. A isca foi produzida pela Chemtica International, S. A., na Costa Rica.

Os tratamentos testados foram:

Tratamento 1 – GA – isca com 3 mg do composto sintético.

Tratamento 2 – GA + Lac – isca com 8 mg de cada composto sintético.

Tratamento 3 – Controle - contendo apenas um pedaço de fruto de cacau.



FIGURA 7. A. ÁREA DE ISOLAMENTO DE ÁRVORE DE CACAU NO CAMPO EXPERIMENTAL DA CEPLAC, EM OURO PRETO DO OESTE (RO). B. ARMADILHA UTILIZADA PARA CAPTURA DOS INSETOS.

FONTE: Rodrigues, M.A.C.M. (2014)

3.6. Análises estatísticas

Para avaliar o período de máxima liberação de feromônio, durante a fotofase e/ou escotofase, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de

Tukey. Os testes de bioensaios utilizando olfatômetro foram comparados pelo teste de X^2 . Para hipótese nula foi considerada uma distribuição de 50:50.

Análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa BioStat 3.0 (AYRES *et al.*, 2003) com nível de significância de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Análise e identificação dos compostos macho-específicos de *Conotrachelus humeropictus*

Após um mês de extrações e análises diárias dos extratos, os insetos iniciaram a liberação de feromônio, o que foi possível observar através da comparação dos perfis de voláteis de machos e fêmeas. Essas comparações demonstraram a presença de quatro compostos voláteis produzidos unicamente pelos machos: **A**, **B**, **C** e **D** (Figura 8). Entretanto, não houve um padrão na frequência de liberação desses compostos, nem mesmo na proporção entre eles. A figura 8 demonstra o perfil de liberação mais representativo dos compostos liberados por machos e a ausência destes no perfil de voláteis de fêmeas. Por conta disso, não foi possível a utilização dos extratos naturais para os bioensaios, pois sendo testados extratos diferentes, as respostas não poderiam ser comparadas. Uma vez que os extratos foram concentrados para 60 μL ($10 \mu\text{L} \cdot \text{inseto}^{-1}$), apenas um extrato seria insuficiente para realização de todos os testes em laboratório.

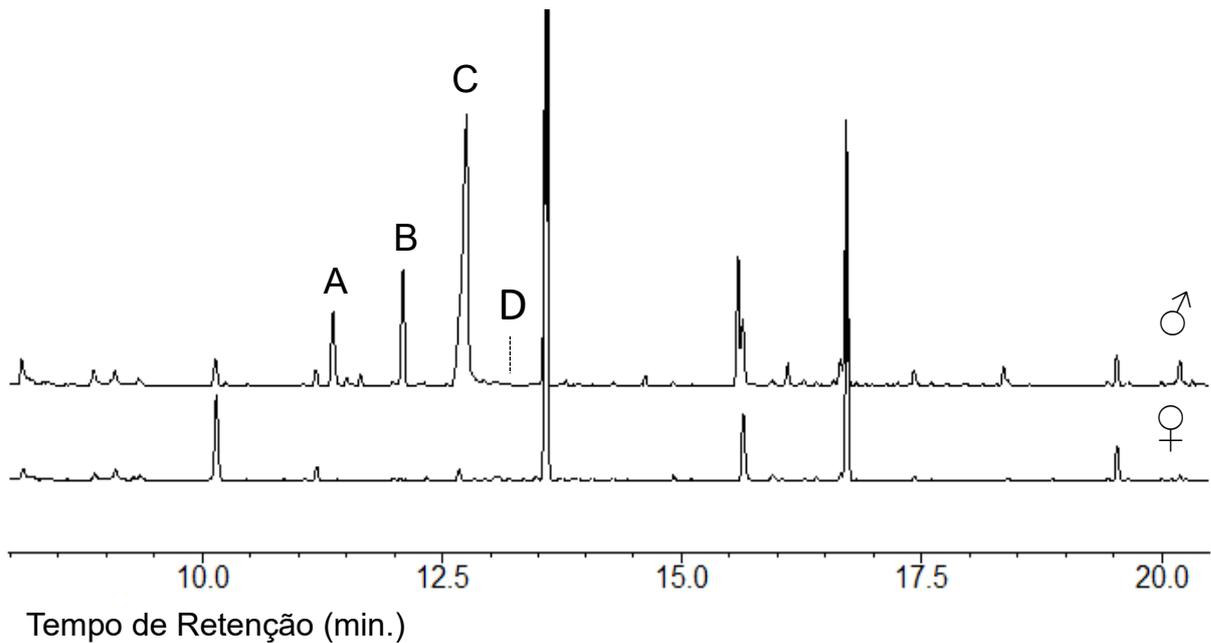


FIGURA 8. COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DE EXTRATOS DE AERAÇÃO (48 HORAS) DE MACHOS (ACIMA) (N=6) E FÊMEAS (ABAIXO) (N=6) DE *Conotrachelus humeropictus*.

4.1.1. Composto A

O tempo de retenção (t_R) do composto **A** foi de 11,3 minutos na coluna utilizada, e o índice de retenção de Kovats (KI) de 1215. O espectro de massas do composto **A** é mostrado na Figura 9 e apresenta o seguinte padrão de fragmentação: m/z (%) – 154 (1), 139 (5), 109 (31), 68 (100), 67 (72), 41 (27). Este padrão mostrou alta similaridade com o grandisol. Após a análise do padrão comercial do monoterpene grandisol e da comparação do seu tempo de retenção e espectro de massas com os do composto **A** presente nos extratos de machos, a identificação foi confirmada.

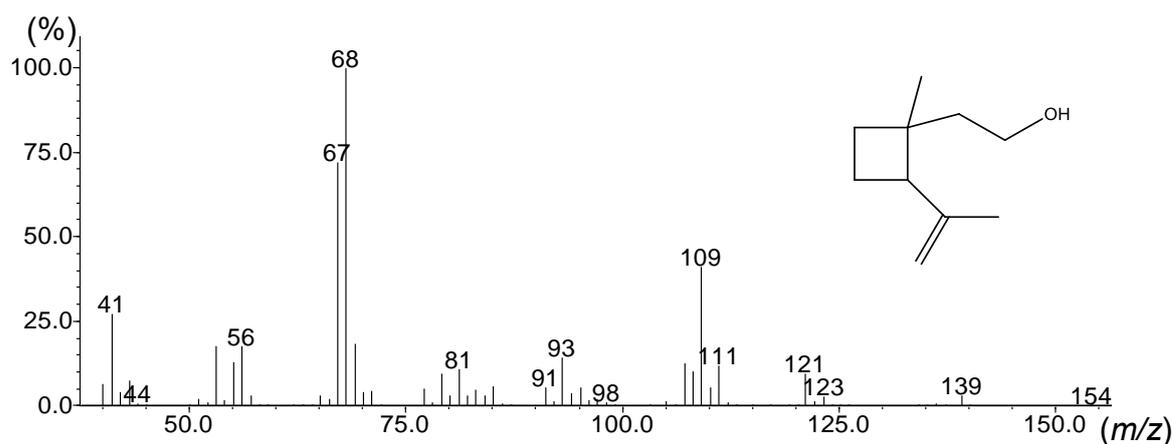


FIGURA 9. ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO A, GRANDISOL.

A molécula apresenta dois centros quirais e, para a determinação da configuração absoluta da estrutura natural emitida por machos de *C. humeropictus*, foram realizadas comparações com o padrão sintético comercial racêmico e o isômero 1*R*,2*S*-grandisol. As análises na coluna de fase estacionária quiral (β -ciclodextrina) permitiram deduzir que o grandisol presente no extrato natural coeluiu com o isômero 1*R*,2*S*-grandisol (Figura 10), comprovando a disposição espacial dos átomos desta molécula: 1*R*,2*S*-grandisol.

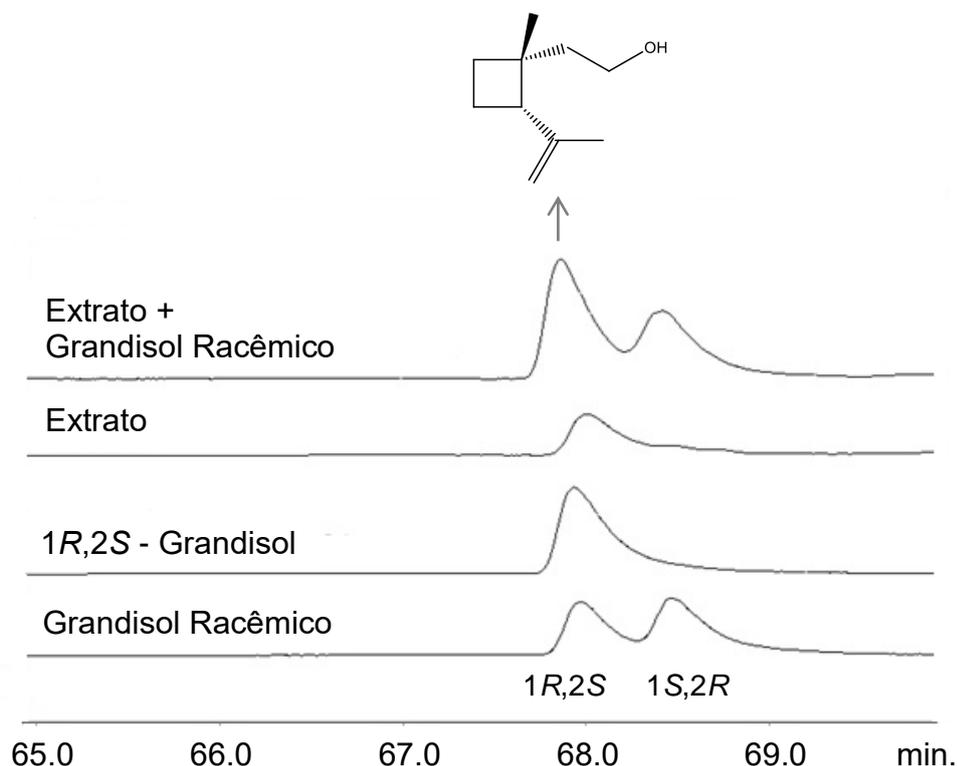


FIGURA 10. ANÁLISES COMPARATIVAS DA QUIRALIDADE DO COMPOSTO NATURAL COM AMOSTRAS SINTÉTICAS DE GRANDISOL (ISÔMERO 1R,2S E MISTURA RACÊMICA) EM COLUNA QUIRAL.

4.1.2. Composto B

O composto **B** apresentou t_R em 12,0 minutos na coluna utilizada e KI de 1252. O espectro de massas apresentou fragmentos característicos, os quais sugerem se tratar de um composto derivado do ácido grandisóico. Porém, o padrão de fragmentação deste composto indica se tratar de um composto inédito, por não haver descrição de um composto com espectro de massas semelhante.

Os estudos de identificação sugerem algumas ideias acerca da estrutura molecular. No entanto, para a confirmação desta hipótese, é necessária a síntese das estruturas moleculares, atividade relativamente complexa para o âmbito desta dissertação, pois isto implica em um trabalho de longa duração a ser realizado.

4.1.3. Composto C

O composto majoritário apresentou t_R em 12,6 minutos e KI de 1287. O espectro de massas deste composto apresentou o seguinte padrão de fragmentação: m/z (%) 168 (1), 153 (7), 125 (9), 108 (34), 68 (100), 41 (16) (Figura 11). A biblioteca de espectro de massas NIST mostrou alta similaridade com o composto ácido grandisóico. Além dessa similaridade, a molécula proposta apresenta deformação do pico do tipo *fronting*, típico para ácidos carboxílicos (Figuras 8 e 14). Para a confirmação da estrutura da molécula, o extrato natural de machos contendo o composto **C** foi comparado com um padrão sintético comercial do composto ácido grandisóico. Comparando os tempos de retenção e os espectros de massas, foi confirmada a estrutura molecular do composto **C** como ácido grandisóico.

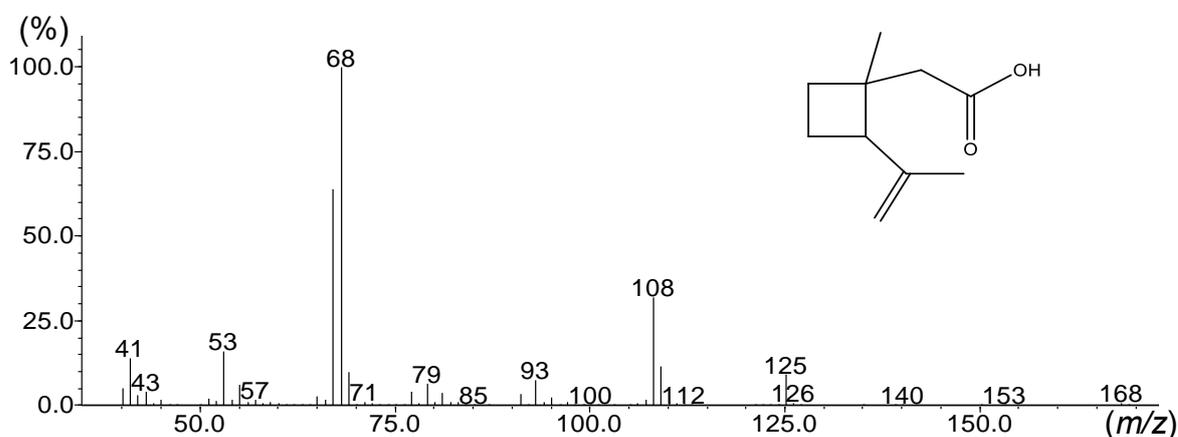


FIGURA 11. ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO C, ÁCIDO GRANDISÓICO.

A molécula do ácido grandisóico apresenta dois centros quirais, assim como o grandisol e, para a determinação da configuração absoluta deste composto, uma amostra de extrato natural de machos foi reduzida para o álcool grandisol. Por haver disponibilidade apenas de um dos isômeros do grandisol (1*R*,2*S*-grandisol) foi feita

uma reação de redução do ácido grandisóico para o álcool, utilizando hidreto de lítio e alumínio e, então, feitas comparações com injeções em coluna de fase estacionária quiral. Análises demonstraram a coeluição do extrato reduzido com o isômero 1*R*,2*S*-grandisol, demonstrando, assim, que o ácido grandisóico apresenta a mesma configuração absoluta do grandisol (Figura 12).

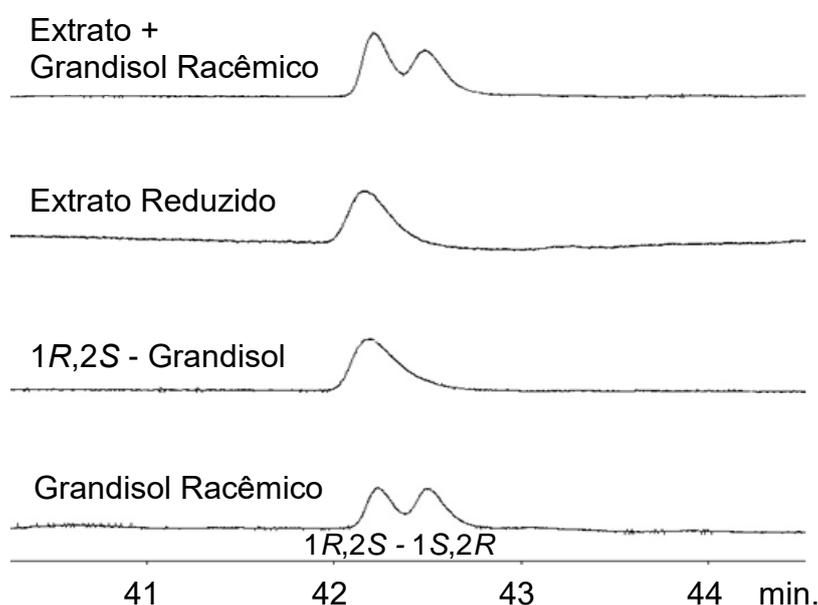


FIGURA 12. ANÁLISES COMPARATIVAS DA QUIRALIDADE DO COMPOSTO NATURAL REDUZIDO COM AMOSTRAS SINTÉTICAS DE GRANDISOL (ISÔMERO 1*R*,2*S* E MISTURA RACÊMICA) EM COLUNA QUIRAL.

4.1.4. Composto D

O composto minoritário apresentou t_R em 13 minutos na coluna utilizada, e KI de 1336. O espectro de massas do composto **D** (Figura 13) apresenta o seguinte padrão de fragmentação: m/z (%) 168 (1), 153 (7), 140 (22), 125 (100), 69 (29), 43 (27). Este padrão de fragmentação sugeriu se tratar de um composto derivado do ácido grandisóico (composto **C**). Porém, este padrão de fragmentação é diferente

dos compostos já relacionados com o ácido grandisóico, sugerindo ser um composto inédito. Por apresentar o fragmento m/z 125, sugeriu se tratar de uma lactona, sendo a proposta inicial a de uma lactona derivada da ciclização do ácido grandisóico. O produto da reação de ciclização foi analisado em GC-MS e, comparando o espectro de massas e t_R com o composto natural, foi comprovado que o composto **D** é o 2,2,6-trimetil-oxabicyclo[4.2.0]octan-4-ona.

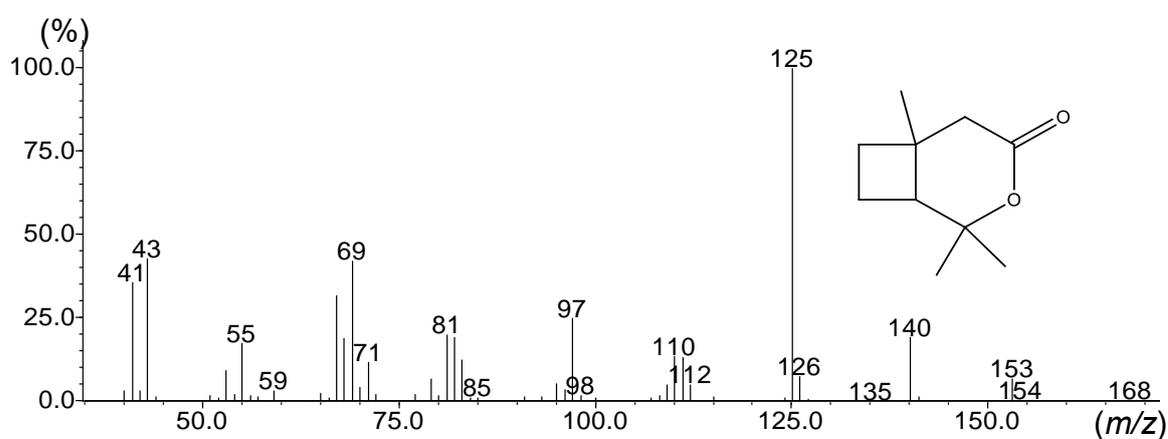


FIGURA 13. ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO D, UM COMPOSTO INÉDITO, 2,2,6-TRIMETIL-OXABICICLO[4.2.0]OCTAN-4-ONA.

A configuração absoluta não foi determinada devido à baixa concentração do composto **D** nos extratos. Uma vez que a biossíntese da lactona deve estar relacionada com a do grandisol e ácido grandisóico, é esperada que a configuração absoluta da lactona também seja 1*R*,2*S*.

Os compostos identificados, grandisol, ácido grandisóico e a lactona (Figura 14), compõem um complexo de compostos derivados do grandisol, juntamente com outros compostos como grandisal e grandlure.

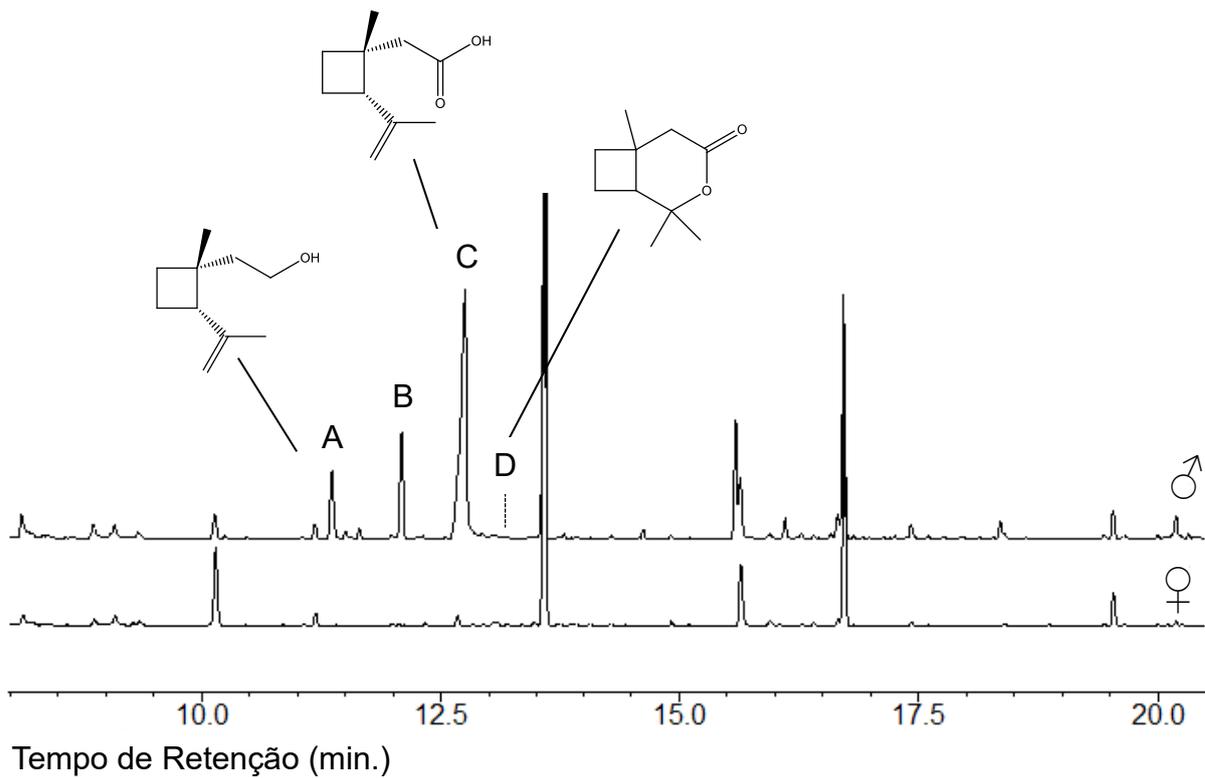


FIGURA 14. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE VOLÁTEIS DE MACHOS E FÊMEAS DE *Conotrachelus humeropictus*, INDICANDO NOS COMPOSTOS **A** (GRANDISOL), **C** (ÁCIDO GRANDISÓICO) E **D** (LACTONA) AS ESTRUTURAS MOLECULARES DOS COMPOSTOS MACHO-ESPECÍFICOS IDENTIFICADOS.

4.2. Avaliação da atividade biológica de *C. humeropictus* mediante os compostos sintetizados

Os compostos identificados foram testados em laboratório através de bioensaios. Foram utilizados apenas os compostos na forma sintética. Em campo, os compostos sintetizados foram testados como atrativos em armadilhas.

A técnica de eletroantenografia foi aplicada para observar a detecção da antena para os compostos ativos, porém os resultados não foram satisfatórios. Foi observada apenas uma pequena resposta, para o composto majoritário, ácido grandisóico, e os outros compostos não mostraram resposta eletrofisiológica da antena.

4.2.1. Quantificação

As análises revelaram que um inseto libera uma média de 235 ± 73 ng de ácido grandisóico por dia. Com base na quantificação do composto majoritário, a proporção entre os compostos não foi calculada devido às variações entre os compostos.

As análises da periodicidade de emissão dos compostos demonstraram que a liberação de feromônio de *C. humeropictus* ocorre de forma mais intensa durante a escotofase ($76 \pm 3\%$) (Figura 15).

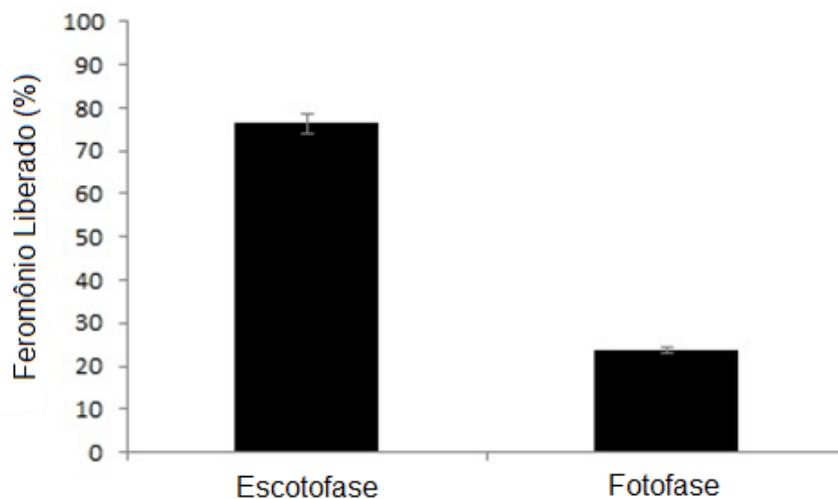


FIGURA 15. EMISSÃO MÉDIA DO COMPOSTO MAJORITÁRIO, ÁCIDO GRANDISÓICO, DURANTE A ESCOTOFASE E FOTOFASE (N=3).

4.2.2. Bioensaios

Nos testes com olfatômetro, muitos insetos permaneceram parados durante o período de observação, não escolhendo nenhum dos lados do tubo, assim, ficaram fora do n total de insetos testados. Apesar de não mostrarem preferência por nenhum dos braços do olfatômetro, muitas vezes os insetos demonstraram reconhecer o composto testado, abrindo os élitros e as asas posteriores, também movimentando o abdome. Este comportamento foi observado tanto para machos quanto para fêmeas, para todos os compostos testados.

Os resultados dos bioensaios com machos demonstraram atratividade significativa apenas para o tratamento com os compostos grandisol e ácido grandisóico testados juntos, no tratamento 4 (Figura 16).

Os resultados com fêmeas demonstraram que grandisol com lactona e ácido grandisóico com lactona foram significativos (tratamento 5 e 6, respectivamente) (Figura 17). Quando os compostos grandisol e ácido grandisóico foram testados separadamente, a resposta não foi significativa. Entretanto, a adição de 3 μL de solução de 1 ppm da lactona foi suficiente para aumentar significativamente as respostas de fêmeas para os tratamentos (Figura 17).

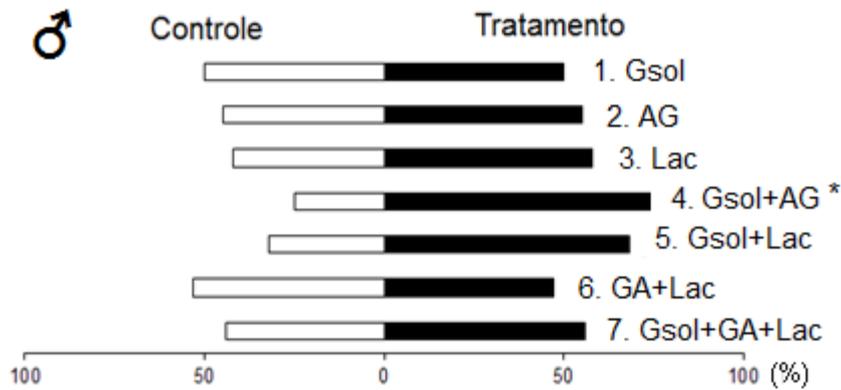


FIGURA 16. RESULTADO DE BIOENSAIOS COM MACHOS DE *Conotrachelus humeropictus* TESTADOS EM OLFATÔMETRO DE TUBO EM Y, NOS SETE TRATAMENTOS. N=40 (* SIGNIFICATIVO) TESTE QUI-QUADRADO. TRATAMENTO 4 $p=0,016$.

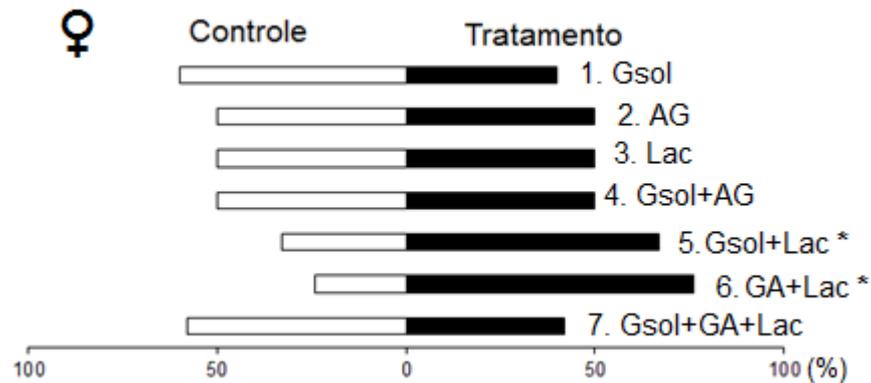


FIGURA 17. RESULTADO DE BIOENSAIOS COM FÊMEAS DE *Conotrachelus humeropictus* TESTADAS EM OLFATÔMETRO DE TUBO EM Y, NOS SETE TRATAMENTOS. N=30 (* SIGNIFICATIVO).TESTE QUI-QUADRADO. TRATAMENTO 5 $p=0,026$ TRATAMENTO 6 $p=0,018$

4.2.3. Teste de atratividade em campo

Foi realizada uma avaliação preliminar, na qual foram testados os compostos, ácido grandisóico e lactona, pois até o momento da avaliação, o composto grandisol ainda não havia sido identificado. Para todas as tentativas desta avaliação, para nenhum dos tratamentos foram obtidos insetos capturados nas armadilhas.

5. DISCUSSÃO

O feromônio de *C. humeropictus* é liberado exclusivamente por machos, seguindo a tendência encontrada entre os feromônios identificados para a família Curculionidae (AMBROGI, PALACIO & ZARBIN, 2012; BARTELT, 1999). Entretanto, também já foram reportados feromônios liberados por fêmeas, feromônio sexual de longa distância, de contato e deterrente à oviposição (BARTELT, 1999).

O composto **A**, grandisol, foi identificado através de comparações de espectro de massas e tempo de retenção com padrões sintéticos, os quais confirmaram sua estrutura. O Índice de Kovats já foi descrito anteriormente para o grandisol, apresentando um KI de 1793, porém a análise foi feita em coluna CP-Wax (INNOCENZI, & CROSS, 2001). Por ter sido analisado em coluna diferente, os dados não podem ser comparados.

O composto grandisol já foi descrito como feromônio de outras onze espécies de Curculionidae: *Pseudopiazurus papayanus* Marshall 1922, *Anthonomus grandis* Boheman 1843, *Anthonomus rubi* Herbst 1795, *Curculio caryae* Horn 1873, *Pissodes approximatus* Hopkins 1911, *Pissodes nemorensis* Germar 1824, *Pissodes strobi* Peck 1817, *Pityogenes bidentatus* Herbst 1783, *Pityogenes calcaratus*, Eichhoff 1878, *Pityphthorus pityographus* Hatzeburg 1837 e *Sternechus subsignatus* Boheman 1836 (MOREIRA, ZARBIN & FRANCKE, 2004; TUMLINSON, 1969; INNOCENZI, 2001; HENDIN, *et al.* 1997; BOOTH *et al.*, 1983; PHILLIPS *et al.*, 1984; FRANCKE *et al.*, 1995; FRANCKE *et al.*, 1987; AMBROGI, PALACIO & ZARBIN, 2012).

A primeira descrição de um feromônio na ordem Coleoptera foi feita para *Anthonomus grandis*, em 1969, sendo grandisol um dos compostos encontrados na

mistura (TUMLINSON, 1969). Mais recentemente, em 2013, o grandisol foi descrito por Byers, Birgersson e Francke como feromônio da espécie *Pityogenes bidentatus*. Segundo o banco de dados Pherobase (EL-SAYED, 2014), o grandisol não foi descrito para outras ordens de insetos, tampouco para outras famílias de Coleoptera.

Sabe-se que a determinação da quiralidade molecular é essencial em estudos de comunicação química dos insetos, uma vez que a detecção e a resposta ocorrem predominantemente para o enantiômero produzido pelo inseto ou então, pela mistura racêmica (DICKENS & MORI, 1989). Em casos extremos, como visto para *Anthonomus grandis*, o inseto produz uma mistura de compostos, sendo um deles o 1*R*,2*S*-(+)-grandisol. Neste caso, a espécie apresenta uma resposta comportamental para os dois isômeros possíveis desta molécula, não apresentando especificidade na resposta (DICKENS & MORI, 1989).

Em outros casos, a mínima presença do enantiômero contrário ao liberado pelo inseto, inibe a resposta. Este exemplo é observado nas espécies *Gnathotrichus retusus* e *G. sulcatus*, no qual *G. retusus* produz (S)-(+)-sulcatol e *G. sulcatus* produz o (R)-(-)-sulcatol, estruturas moleculares demonstradas anteriormente na Figura 3. A espécie *G. retusus* responde apenas ao (S)-(+)-sulcatol, porém não responde à mistura racêmica, ou seja, a presença do isômero (R)-(-)-sulcatol inibe a resposta de *G. retusus*. Já *G. sulcatus*, não responde para (S)-(+)-sulcatol isoladamente. Porém, quando 1% de (R)-(-)-sulcatol é adicionado na mistura, ele passa a responder. A intensidade de respostas aumenta com a maior quantidade deste composto, demonstrando assim, a especificidade de cada espécie para os enantiômeros (BORDON *et al.*, 1980).

O composto **C**, ácido grandisóico, já foi descrito para outra espécie do gênero *Conotrachelus*, por Eller e Bartelt (1996), no qual o gorgulho da ameixa, *C. nenuphar*, apresentou pela primeira vez o composto. Foi sugerido ácido grandisóico como nome popular, por ser análogo ao grandisol. Neste trabalho, Eller e Bartelt observaram em armadilhas em campo a atração de machos e fêmeas de *C. nenuphar* ao ácido grandisóico, considerando-o um feromônio de agregação. Desde então, este composto não foi encontrado como feromônio de nenhuma outra espécie (EL-SAYED, 2014).

Uma busca na base de dados SciFinder Scholar, utilizando como instrumento de busca a estrutura molecular do composto **D**, demonstrou que este ainda não havia sido descrito como um composto natural. Segundo a base de dados Pherobase (EL-SAYED, 2014), a última descrição de um composto inédito para a família Curculionidae foi em 2012, quando o composto (E)-2-(3,3-dimetilciclohexilideno) ácido acético foi descrito para a espécie *Sternechus subsignatus* Boheman, 1836 (AMBROGI, PALACIO & ZARBIN, 2012).

Desde que diversas estruturas moleculares foram identificadas para várias espécies, pôde-se notar uma tendência na similaridade nas estruturas, conforme a proximidade filogenética. No caso dos compostos encontrados como feromônio de *C. humeropictus*, o grandisol, por exemplo, também foi identificado como feromônio de onze espécies, todas restritas à família Curculionidae. No caso do ácido grandisóico, este composto foi descrito anteriormente apenas para *C. nenuphar* e agora também para *C. humeropictus*, demonstrando uma proximidade ainda maior por pertencerem ao mesmo gênero.

Juntamente com o grandisol, o ácido grandisóico e a lactona, outros compostos compõem um complexo de compostos derivados, como papayanol,

grandisal, grandlure, grandlure II, III e IV, sendo a lactona um novo composto componente deste complexo. Os demais compostos deste complexo foram todos encontrados para espécies de Coleoptera, como é o caso do composto grandisal para as espécies de curculionídeo *Pseudopiazurus papayanus* Marshall 1922, *Pissodes approximatus*, *P. nemorensi*, *P. strobi* Peck 1817 e *Pityogenes bidentatus* (EL-SAYED, 2014). O composto grandlure II também foi descrito para cinco outras espécies de Curculionidae: *Anthonomus eugenii*, *A. grandis*, *A. musculus*, *A. rubi* e *Curculio caryae* (EL-SAYED, 2014). Este exemplo demonstra a importância da interdisciplinaridade na ecologia química, principalmente sobre o conhecimento da filogenia do grupo em estudo. Na ecologia química, é essencial compreender os compostos químicos, em conjunto com a evolução das interações com os demais seres vivos.

A determinação da configuração absoluta dos compostos feromoniais liberados por *C. humeropictus* demonstrou que os dois compostos que o inseto produz, grandisol e ácido grandisóico, apresentam a mesma disposição espacial dos átomos, 1*R*,2*S*.

A configuração absoluta do grandisol para a espécie *C. humeropictus*, determinada 1*R*,2*S*, foi também a mesma descrita para as espécies *Pityophthorus pityographus*, *Pissodes strobi*, *P. nemorensis* e *Anthonomus grandis*. Para as demais espécies que liberam o composto grandisol, não foi determinada a configuração absoluta da molécula (EL-SAYED, 2014). A configuração do ácido grandisóico para *C. humeropictus* também foi a mesma encontrada para a espécie *C. nenuphar*, 1*R*,2*S* (ELLER & BARTELT, 1996). Uma vez que esta lactona é um composto derivado do grandisol e do ácido grandisóico e a sua biossíntese deve estar

relacionada com estes compostos, é esperada que a configuração absoluta da lactona, por uma questão energética, também seja 1*R*,2*S*.

O fato de o inseto produzir dois compostos derivados, com a mesma configuração absoluta, evidencia a tendência do inseto a percorrer o caminho de menor gasto energético durante a síntese natural de moléculas necessárias para sua comunicação (SEYBOLD & WANDERWEL, 2003).

Estudos de biologia de *C. humeropictus* apontam que o período noturno é quando ocorre a maior atividade biológica do inseto (TREVISAN *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 1998). Segundo Oliveira (1998), atividades biológicas de *C. humeropictus* durante o período noturno foram marcadas principalmente por caminhamento e ocasionalmente por curtos voos.

Assim como para *C. humeropictus*, para outras espécies de *Conotrachelus*, também foi detectada maior atividade no período noturno, como foi o caso de *C. psidii* Marshall 1922 e *C. nenúfar* Herbst 1797 (RACETTE *et al.*, 1992). Em estudo de atratividade de *C. nenuphar* em armadilhas, as capturas ocorreram com maior intensidade durante a noite (LAMOTHE, 2008).

A quantificação por fotoperíodo mostrou que a liberação de feromônio da espécie *C. humeropictus* ocorre principalmente durante o período noturno, confirmando assim a suposição inicial, uma vez que o feromônio é liberado durante o período de maior atividade do inseto.

A proporção entre os compostos liberados por *C. humeropictus* não apresentou uma constante entre os quatro compostos. Na maioria dos extratos, o ácido grandisóico (composto **C**) se apresentou como composto majoritário e a lactona (composto **D**) como o composto minoritário. No entanto, a proporção entre

os quatro não foi estabelecida por estes apresentarem muita variação. Não foram encontrados trabalhos que relatem essa variação na proporção entre compostos.

A indisponibilidade de um alimento adequado, frutos novos e folhas de cacau ou cupuaçu, sugere que o inseto não se comporta de mesma forma como na natureza. Por terem sido alimentados com cana-de açúcar, pode ter havido a falta de algum componente essencial para que a comunicação química fosse perfeita, já que o alimento muitas vezes é fundamental para a liberação de feromônio e está muitas vezes relacionado com a sua síntese. Nenhum trabalho foi encontrado relacionando o perfil do feromônio liberado com diferentes fontes alimentares.

Hock e colaboradores (2014) descreveram que a umidade juntamente com a presença de alimento adequado é fundamental para a produção do feromônio de *Conotrachelus nenuphar*. O ar que circulava na câmara durante o processo de aeração de *C. humeropictus* foi umidificado, entretanto, não é possível afirmar se foi o suficiente para que o ar estivesse altamente umidificado. Uma vez que a umidade alta é fundamental para o desenvolvimento de *C. humeropictus* (TREVISAN *et al.*, 2010), esta pode interferir na produção de feromônio da espécie.

Os testes em olfatômetro com machos de *C. humeropictus* demonstraram a atratividade para os grandisol e ácido grandisóico quando testados em conjunto. Esse comportamento não era esperado, uma vez que o inseto produz uma mistura de quatro compostos e esperava-se que a mistura dos três compostos identificados fosse mais atrativa. A presença da lactona, em testes com machos não foi determinante em uma maior atratividade. Por outro lado, os testes com fêmeas de *C. humeropictus* demonstram que a presença da lactona é fundamental na sua atratividade. Tanto o grandisol quanto o ácido grandisóico, quando testados separadamente, não foram atrativos, porém com a presença da lactona, alterou

significativamente a atração das fêmeas quando estes compostos separadamente foram testados conjugados com a lactona.

Essas análises apontam a possibilidade da lactona ter uma atividade no comportamento sexual, por ocasionar maior atratividade de fêmeas e o mesmo não ocorrer com os machos. Mesmo que a lactona apresente função sexual sobre as fêmeas, era esperado que a atratividade de fêmeas para a mistura grandisol + ácido grandisóico ocorresse, assim como ocorreu para os machos, demonstrando que estes compostos combinados têm função de agregação. No entanto, as fêmeas foram atraídas para combinações diferentes.

A maior parte dos feromônios descritos para Curculionidae são feromônios de agregação liberados por machos, os quais atraem tanto os machos quanto as fêmeas (BARTELT, 1999). O composto grandisol foi descrito com atividade de agregação para *A. grandis*, *A. rubi*, *P. approximatus*, *P. nemorensis*, *P. strobi*, *P. bidentatus* e *P. calcaratus* (BYERS; BIRGERSSON & FRANCKE, 2013; INNOCENZI, HALL & CROSS, 2001; MOREIRA, ZARBIN & FRANCKE, 2004; DICKENS & PRESTWICH, 1989; MENDEL, 1988; BOOTH *et al.*, 1983). O mesmo foi encontrado para o ácido grandisóico para *C. nenuphar* (ELLER & BARTELT, 1996).

Nos resultados de olfatômetro em Y era esperada a atração de machos e fêmeas para a mistura dos compostos identificados. Acredita-se que a presença do composto **B** nos testes altere o resultado na atratividade dos insetos. A ausência de um composto na mistura pode ser fundamental na comunicação química dos insetos por se tratar de respostas muito específicas. Mazomenos e Haniotakis (1981) demonstraram que, em laboratório, a ausência de um dos quatro compostos feromonais liberados pelo inseto diminuiu em 42% a atratividade para a mistura.

De acordo com Bartelt (1999), estudar o comportamento de gorgulhos em laboratório é relativamente difícil, pois eles respondem de forma lenta ou sutil. Nos bioensaios, os insetos, muitas vezes, nem mesmo respondiam aos testes, permanecendo imóveis durante o período de observação. Apesar de não serem atraídos para nenhum dos braços do olfatômetro, em sua maioria, os insetos demonstraram perceber o composto testado, em um comportamento de abrir os élitros e as asas posteriores, movimentando também o abdome. De acordo com Oliveira (1998), este comportamento faz parte da corte entre o casal, como parte do chamamento. Este comportamento foi observado tanto para machos quanto para fêmeas, demonstrando que, apesar de não ser atrativo, o inseto demonstra perceber o composto, o que pode indicar a ausência de um ou mais compostos para que a atratividade ocorra.

Apesar de terem sido testados em campo apenas dois compostos macho-específicos, em laboratório a mistura dos dois compostos, ácido grandisóico e lactona, teve como resultado a atração de fêmeas. Portanto, era esperado que ao menos as fêmeas fossem atraídas pela isca. No entanto, em campo nenhum inseto foi capturado para nenhum dos tratamentos. Vale lembrar que no tubo em Y, o inseto recebe os voláteis diretamente através de um fluxo de ar em sua direção, portanto o inseto responde mais facilmente. Em campo, entretanto, muitos fatores podem afetar a atratividade como, por exemplo, a armadilha (modelo, cor e altura da instalação) ou a concentração dos compostos na isca (SCHAUFF, 1986). O local ou posição de instalação pode ser fundamental para o sucesso na captura de insetos, da mesma forma, a cor da armadilha pode ter influência na atratividade, demonstrado por Bavaresco (2005) em testes com lepidópteros. Para diminuir esses

efeitos, a armadilha utilizada foi a mesma recomendada para captura de *Anthonomus grandis*, similar à utilizada na captura de *C. nenuphar*.

O monitoramento de *C. nenuphar* utilizando iscas com atrativo, tem se apresentado eficiente na coleta em cultivos de ameixa, maçã e pera (LESKEY & WRIGHT, 2004; PROKOPY *et al.*, 2003). O feromônio de *C. nenuphar*, ácido grandisóico, foi testado em combinações com limoneno e etil isovalerato ou benzaldeído, que são compostos presentes no fruto hospedeiro, demonstrando aumentar a captura para alguns tratamentos (PROKOPY *et al.*, 2003).

A partir dos resultados encontrados, acredita-se que o fato de nenhum inseto ter sido capturado, tenha ocorrido pela ausência do composto **B** (composto não identificado) e/ou composto **D** (lactona). A ausência do composto **B** nos testes de olfatômetro em Y também deixou em aberto o comportamento do inseto mediante a presença deste composto e, principalmente, da presença deste na mistura. Este composto pode ser fundamental na atratividade, porém, para o sucesso da utilização de feromônio de *C. humeropictus* faz-se necessária a continuidade deste trabalho, com a síntese do composto **B** e, posteriormente, testes de atratividade em laboratório e em campo.

A técnica de eletroantenografia foi empregada para observar o reconhecimento da antena para os compostos sintetizados, entretanto, não foram encontradas respostas suficientes para caracterizar atividade na antena de *C. humeropictus*. Através desta técnica as antenas foram testadas de diversas maneiras. As antenas são normalmente extraídas dos insetos através de pinça fina e, então, dispostas entre os eletrodos contendo gel condutor, e isso foi feito na maior parte dos testes realizados neste trabalho. Também foram realizadas tentativas de extrair a cabeça, como sugerido por outros autores para melhorar a resposta,

porém sem êxito (FICCOLI, ANFORA & TASIN, 2011). Outros autores mantêm o inseto vivo e paralisado, como fizeram para *C. nenuphar* (LESKEY *et al.*, 2009), porém, esta técnica depende de um equipamento que não estava disponível para este trabalho. Alguns extraem os primeiros segmentos da antena para que o gel condutor entre em contato diretamente com ela. No entanto, apesar de todas as metodologias testadas, a única resposta obtida foi quando a antena foi retirada do inseto e posicionada entre os eletrodos minutos depois da injeção, tempo suficiente para a antena estabilizar, mas ainda estar bastante sensível.

Os testes de antena com curculionídeos são mais difíceis de conseguir respostas pelo fato de apresentarem maior concentração de sensilas na clava da antena, quando esta deve estar livre do gel para perceber os compostos e, no entanto, é a parte que entra em contato com o gel condutor.

Cada espécie responde de forma diferente em EAG e, quando alguns autores encontram formas de determinada espécie responder, não necessariamente será a melhor forma para outra espécie responder ao estímulo. Para *C. humeropictus*, entretanto, não foi encontrada uma maneira eficaz na qual o inseto respondesse aos compostos.

6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos de ecologia química de *Conotrachelus humeropictus* realizados nesta dissertação apontaram a presença de quatro compostos produzidos por machos da espécie. A liberação do feromônio foi constatada ocorrer na sua maior concentração durante o período noturno. Três destes compostos foram identificados, grandisol, ácido grandisóico (majoritário) e uma lactona (minoritário) derivada do ácido grandisóico, sendo a primeira descrição desta como um composto natural.

Testes foram realizados para observar a atratividade de machos e fêmeas para os compostos na forma sintética. Os bioensaios com fêmeas mostraram que a presença da lactona, foi fundamental na atratividade. O composto **B**, que ainda se encontra em processo de identificação, pode ser fundamental para que a atratividade seja maior.

Sabe-se também que o fato do inseto ser mantido em condições climáticas diferentes das encontradas no seu habitat, e da fonte alimentar fornecida não ser a natural pode ter interferido no comportamento da espécie.

Contudo, acredita-se que para que o feromônio de *C. humeropictus* seja aplicado no controle da espécie é necessário que esse trabalho tenha continuidade, com a síntese do composto **B** e, posteriormente, a realização de novos testes de atratividade em laboratório e em campo.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, J.A.D.; GASPAROTTO, L. **Aspectos cronológicos e biológicos da broca-do-fruto (*Conotrachelus* sp. FIEDLER, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) no cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) e seu controle.** Embrapa Amazônia Ocidental. Séries Documentos. Manaus, n. 3, p. 17, 1999.

ALVES, R.M. *et al.* **Evolução da vassoura-de-bruxa e avaliação da resistência em progênies de cupuaçuzeiro.** Revista Brasileira de Fruticultura, v. 31, n. 4, p. 1022-1032, dez., 2009.

ALVES, S.A.M. *et al.* **Curvas de progresso e gradientes da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, Bahia.** Fitopatologia Brasileira, v. 31, p. 483-491, 2006.

AMBROGI, B.G., ZARBIN, P.H.G. **Aggregation Pheromone in *Sternechus subsignatus* (Coleoptera: Curculionidae): Olfactory Behaviour and Temporal Pattern of Emission.** Journal of Applied Entomology, v. 132, p. 54-58, 2008.

AMBROGI, B.G.; VIDAL, D.M., ZARBIN, P.H.G., ROSADO-NETO, G.H. **Feromônios de agregação em Curculionidae (insecta: coleoptera) e sua implicação taxonômica.** Química Nova, v. 32, p. 2158-2158, 2009.

AMBROGI, B.G.; PALACIO, A.M.C; ZARBIN; P.H.G. **Identification of male-produced aggregation pheromone of the curcuionid beetle *Sternechus subsignatus*.** Journal of Chemical Ecology, v. 38, p. 272-277, 2012.

AYRES, M. *et al.* **BioEstat 3.0 Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** Sociedade Civil Mamirauá, Belém. 2003.

BAKER, T.C.; LIN, C.E. **Wind tunnels in pheromone research.** In: HUMMEL, H.E. & MILLER, T.H. (eds) *Techniques in pheromone research.* Springer-Verlag, New York, p. 75-110. 1984.

BAELO, C.U. *et al.* **Algunos principios activos del café, del té y del cacao.** Spin Cero, n. 6, p. 16-19, 2002.

BARTELT, R. J. **Weevils.** In: HARDIE, J. & MINKS, A. K. (eds.) *Pheromones of Non-Lepidopteran Insects Associated with Agricultural Plants.* CABI Publishing: Wallingford, cap. 5, 1999.

BASTOS, C.N.; EVANS, H.C. **A new pathotype of *Crinipellis pernicios* (witches' broom disease) on solanaceous hosts.** *Plant Pathology*, v. 34, p. 306-312, 1985.

BAVARESCO, A. *et al.* **Efeito da altura de posicionamento e da cor de armadilhas de feromônio na captura de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick, 1909) (Lepidoptera: Tortricidae) na cultura do caqui.** *Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo*, v. 72, n. 3, p. 373-377, jul./set., 2005.

BENTO, J.M. **Fundamentos do monitoramento, da coleta massal e do confundimento sexual e insetos-praga.** In: VILELA E.F. & DELLA LUCIA, T.M.C. (eds) *Feromônio de insetos: biologia, química e aplicação.* Ribeirão Preto: Holos, cap.16, p. 135-144, 2001.

BYERS, J.A.; BIRGERSSON, G.; FRANCKE, W. **Aggregation pheromones of bark beetles, *Pityogenes quadridens* and *P. bidentatus*, colonizing Scotch pine: olfactory avoidance of interspecific mating and competition.** Chemoecology, v. 23, p. 251-261, 2013.

BOOTH, D.C. *et al.* **Aggregation pheromone components of two species of *Pissodes weevils* (Coleoptera: Curculionidae): isolation, identification, and field activity.** Journal of Chemical Ecology, v. 9, p. 1-12, 1983.

BORDON, J.H. *et al.* **Enantiomer-based specificity in pheromone communication by two sympatric *Gnathoirichus* species (Coleoptera: Scolytidae).** Journal of Chemical Ecology, v. 6, n. 2, p. 445-456, 1980.

BUTENANDT, von A. *et al.* **Über den sexuallockstoff des seidenspinners *Bombyx mori*.** Reindarstellung und konstitution. Z. Naturforsch. B., v. 14, p. 283-284, 1959.

CERUTI, F.C. **Interações entre feromônios de insetos e semioquímicos de plantas.** Revista Acadêmica, v. 5, n. 1, p. 73-82, 2007.

CUATRECASAS, J. **Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*.** Contributions From The United States National Herbarium, v. 35, p. 379-614, 1964.

DICKENS, C.J.; MORI, K. **Receptor chirality and behavioral specificity of the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae), for its**

pheromone, (+)-grandisol. Journal of Chemical Ecology, v. 15 n. 2 p. 517-528, 1989.

DICKENS, J.C.; PRESTWICH, G.D. **Differential recognition of geometric isomers by the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae): evidence for only three essential components in aggregation pheromone.** Journal of Chemical Ecology, v. 15 p. 529-540, 1989

EL-SAYED AM. **The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals.** 2003-2014. Disponível em: <<http://www.pherobase.com>> Acesso em 2014.

ELLER, F.J.; BARTELT, R.J. **Grandisoic acid, a male-produced aggregation pheromone for the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*.** Journal of Natural Products, v. 59, p. 451-453, 1996.

ETENG, M.U. *et al.* **Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: a review.** Plant Foods for Human Nutrition, v. 51, n. 3, p. 231-243, 1997.

FAOSTAT. **Countries by commodity: Cocoa, beans.** 2012 Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> Acesso em 05.11.2013.

FACCOLI, M., ANFORA, G.; TASIN, M. **Stone Pine Volatiles and Host Selection by *Tomicus destruens* Wollaston (Coleoptera: Curculionidae, Scolytidae).** Silva Lusitana, Portugal, nº especial, p. 61 - 73, 2011.

FRAIRE-FILHO, G de A. **Cupuaçu.** s/d. Disponível em:<<http://www.ceplac.gov.br/radar/cupuaçuzeiro.htm>> Acesso em 20.10.2013.

FRANCKE, W. *et al.* **Identification of “pityol” and “grandisol” as pheromone components of bark beetle, *Pityophthorus pityographus*.** *Naturwissenschaften*, v. 74, p.343-345, 1987.

FRANCKE, W. *et al.* **Semiochemicals from bark beetles: new results, remarks, and reflections.** *Journal of Chemical Ecology*, v.21, p. 1043-1063, 1995.

FURLAN, L.M. **Estudo morfológico e anatômico de dois genótipos de cacauero (*Theobroma cacao* L.) submetidos a diferentes condições de radiação solar.** Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. **Sistemas sensoriais e comportamentais.** Cap. 4, p. 82-106. *Os insetos: Um resumo de entomologia.* Roca Ed., São Paulo Quarta edição. 2012.

HENDIN, P.A. *et al.* **Identification of male pecan weevil [*Curculio caryae*] pheromone.** *Journal of Chemical Ecology*, v. 23, p. 965-977, 1997.

HENDRY, L.B.; WICHMANN, J.K.; HINDENLANG, D.M. **Evidence for origin of insect sex pheromones: presence in food plants.** *Science*, v. 188, p. 59-62, 1975.

HOCK, V. *et al.* **Establishing abiotic and biotic factors necessary for reliable male pheromone production and attraction to pheromone by female plum**

curculios *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). Canadian Entomologist, v. 00, p. 1-20, 2014.

INNOCENZI, P.J.; HALL, D.R.; CROSS, J.V. **Components of male aggregation pheromone of strawberry blossom weevil, *Anthonomus rubi* Herbst. (Coleoptera: Curculionidae).** Journal of Chemical Ecology, v. 27, p. 1203-1218, 2001.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola: Estatística da produção agrícola, setembro de 2013** disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201309.pdf>. Acesso em: 12.10.2014

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia Estatística **Censo agropecuário 2006 – Agricultura familiar: resultados preliminares.** Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/agri_familiar_2006/familia_censoagro2006.pdf>. Acesso em: 12.10.2014

LAKER, H.A.; TREVISAN, O. **The increasing importance of cupuassu (*Theobroma grandiflorum* (Schum) in the Amazon Region of Brasil.** Cocoa Growers'Bulletin, p. 45-52, 1992.

LAMOTHE, S.; CHOUINARD, G.; VINCENT, C. **Abiotic factors and trap design modulate the performance of traps used to monitor the plum curculio.** Journal of Economic Entomology, v.101, n. 6, p. 1838–1846, 2008.

LEAL, W.S. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes Pheromone reception. Topics in Current Chemistry In. Annual Review of Entomology

LESKEY, T.C. *et al.* **Electroantennogram technique for *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae).** Environmental Entomology, v. 38, 2. 3, p. 870-878, 2009.

LESKEY, T.C., WRIGHT, S.E. **Monitoring plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae), populations in apple and peach orchards in the mid-Atlantic.** Journal of Economic Entomology, v. 97, p. 79-88, 2004.

LOPES, J.R.M., LUZ, E.D.M.N.; BEZERRA, J.L. **Suscetibilidade do cupuaçuzeiro e outras espécies vegetais a isolados de *Crinipellis pernicioso* obtidos de quatro hospedeiros diferentes no sul da Bahia.** Fitopatologia Brasileira, v. 26 p. 601-605, 2001.

LOPES, C.M.D.A. **Biologia, comportamento e flutuação populacional da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro *Conotrachelus aff. humeropictus* (Coleoptera: Curculionidae).** INPA-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/UFAM Universidade Federal do Amazonas. Tese (Doutorado). 2000.

LOPES, C.M.D.A.; SILVA, N.M. **Impacto econômico da broca-do fruto do cupuaçuzeiro *Conotrachelus humeropictus* (Coleoptera: Curculionidae), no Amazonas e Rondônia.** Anais da Sociedade Entomológica, Brasil, v. 27, p. 481-483, 1998.

MARTEL, J.H.I. **A cultura do cupuaçuzeiro** (*Theobroma grandiflorum* Schum). In: DONADIO, L.C. *et al.* (eds.). *Fruticultura Tropical*. São Paulo, Jaboticabal, FUNEP, p. 83-99, 1992.

Mazomenos, B.E; Haniotakis. G.E. **A multi component female sex pheromone of *Dacus oleae* Gmel. Isolation and bioassay.** *Journal of Chemical Ecology*, v. 7, p. 437- 443, 1981.

MENDEL, Z. **Attraction of *Orthotomicus erosus* and *Pityogenes calcaratus* to a synthetic aggregation pheromone of *Ips typographus*.** *Phytoparasitica*, v. 16, p. 109-117, 1988.

MENDES, A.C.B. *et al.* **Infecção de *Conotrachelus humeropictus* Fiedler (Coleoptera: Curculionidae) por *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no solo.** *Acta Amazonica*, Manaus, v. 31, n. 4, p. 531-538, 2001.

MENDES, A.C. de B.; MAGALHÃES, B.P.; OHASHI, O.S. **Biologia de *Conotrachelus humeropictus*, Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae), praga do cacau e do cupuaçuzeiro na Amazônia Brasileira.** *Acta Amazônica*, v. 27, n. 2, p. 135-144, 1997.

MENDES, A.C. de B.; GARCIA, J.J.S. **Controle químico de *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940. (Coleoptera: Curculionidae) em casqueiro de cacau (*Theobroma cacao* L.)** In: Congresso Brasileiro de Entomologia, Belo Horizonte, p. 331, 1989.

MENDES, A.C.B.; GARCIA, J.J.S.; TREVISAN, O. **Ocorrência de coleobrocas nos frutos do cacauzeiro em Rondônia.** Informe Fitossanitário, v. 2, p. 1-3, 1982.

MOREIRA, M.A.B.; ZARBIN, P.H.G.; FRANCKE, W. **Chemical ecology of the papaya weevil *Pseudopiazurus papayanus* (Coleoptera: Curculionidae).** ISCE Ottawa, v. 82, 2004.

MOURA, K.C.D.; FIRMINO, T.S.S. ITOYAMA, M.M. **Análise interpopulacional de *Conotrachelus humeropictus* (Curculionidae; Coleoptera) a partir do gene mitocondrial COI.** In: Congresso de Iniciação Científica da Unesp, Barra bonita, São Paulo, 2013.

OEHLISCHLAGER, A. C. *et al.* **Development of pheromone-based trapping system for the American palm weevil *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae).** Journal Economic Entomology, v. 86: p. 1381-1392, 1993.

OLIVEIRA, E.L. *et al.* **Patogenicidade de nematoide *Sterneinema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) em larvas de *Conotrachelus humeropictus* (Coleoptera: Curculionidae).** In: Congresso Brasileiro de Entomologia, Goiânia, Goiás, 2014.

OLIVEIRA, M.L.; LUZ, E.D.M.N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacauzeiro no Brasil.** Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT, p. 132, 2005.

OLIVEIRA, S.P. de. **Dispersão horizontal da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro (*Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940) (Coleoptera: Curculionidae) em**

sistemas agroflorestais de Nova Califórnia, Rondônia. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2003.

OLIVEIRA, S.P. de. **Biologia reprodutiva de *Conotrachelus humeropictus* (Coleoptera: Curculionidae) broca do cupuaçuzeiro em diferentes substratos.** Monografia - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1998

PHILLIPS, T.W. et al. **Aggregation pheromone of deodar weevil, *Pissodes nemeorensis* (Coleoptera: Curculionidae): isolation and activity of grandisol and grandisol.** Journal of Chemical Ecology, v. 10, p. 1417-1423, 1984.

PINTO-ZEVALLOS, D.; ZARBIN, P.H.G. **Química na agricultura: perspectivas para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis.** Química Nova, v. 36, n. 10, p. 1509-1513, 2013.

PROKOPY, R.J. et al. **Odor-baited trap trees: A new approach to monitoring plum curculio (Coleoptera: Curculionidae).** Journal of Economic Entomology, v. 93, n. 3, p. 826-834, 2003.

RACETTE, G. et al. **Ecology and management of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae), in apple orchards.** Phytoprotection, v. 73, n. 3, p. 85-100, 1992.

RAINA, A.K., KINGAN, T.G.; MATTO, A.K. **Chemical signals from host plant and sexual behavior in a moth.** Science, v. 255, p. 592-594, 1992.

REDDY, G.V. & GUERRERO, A. **Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals.** Trends in Plant Science, v. 9, p. 253-261, 2004.

SAID, M.M. **Aspectos culturais e potencial de uso do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd. Ex Spreng. Schum.) no estado do Amazonas.** Manaus Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2011.

SANTOS, V.M.R. *et al.* **Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais.** Química. Nova, v. 30, n. 1, p. 159-170, 2007.

SCHAUFF, M.E. **Collecting and preserving insects and mites: Techniques and tools.** 1986. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/ad_hoc/12754100CollectingandPreservingInsectsandMites/collpres.pdf>. Acesso em: 20.12.2013.

SEYBOLD, S.J. & VANDERWEL, D. **Biosynthesis and endocrine regulation of pheromone production in the Coleoptera.** In: BLOMQUIST, G.J. & VOGT, R.G. (eds.) Insect pheromone biochemistry and molecular biology. Elsevier Academic Press, cap. 6, p. 137-200, 2003.

SENATORE, G.; MUÑOZ, A.I. **Produção de cacau. Panorama cultural.** Mercado e negócios. Agoroanalysis, p. 26, jan, 2013.

SILVA, N.M.; ALFAIA, S.S. **Manejo integrado da broca-do fruto do cupuaçuzeiro (Coleoptera: Curculionidae) em sistemas agroflorestais.** Projeto RECA Nova California. Cascalho Editora INPA – Rondônia, 2004.

SILVA, C.R.S.; VENTURIERI, G.A.; FIGUEIRA, A. **Description of Amazonian *Theobroma* L. collections, species identification, and characterization of interspecific hybrids.** Acta Botanica Brasílica (Impresso) Journal Citation Reports, Brasília, DF, v. 18, n.2, p. 333-340, 2004.

SOUZA, A. das G.C. **Boas práticas agrícolas da cultura do cupuaçuzeiro.** Embrapa Amazônica Ocidental, Manaus – AM, 2007.

SOUZA, A. das G.C. *et al.* **Cultura do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum.)** Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, Circular Técnica, 2, p.39,1999.

STERN, V.M. *et al.* **The integrated control concept.** Hilgardia, v. 29:p. 81-101, 1959.

TAVARES, A.M.; NUNES, A.B. **Estratégias para o controle da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro, *Conotrachelus* sp. (Coleoptera: Curculionidae).** In: XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura, v. 17, 2002.

THOMAZINI, M.J. **A comunicação química entre os Insetos: Obtenção e utilização de feromônios no manejo de pragas.** In: GONCALVES, R.C. & OLIVEIRA, L.C. de (eds.). Embrapa Acre: ciência e tecnologia para o

desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, cap. 17, p. 338-354, 2009.

THOMAZINI, M.J. **Flutuação populacional e intensidade de infestação da broca-dos-frutos em cupuaçu.** Scientia agricola, Piracicaba v. 59, n. 3, p. 463-468, set., 2002.

THOMAZINI, M.J. **Medidas para o controle da broca-dos-frutos do cupuaçuzeiro.** Embrapa-CPAF/AC. Instruções Técnicas, Rio Branco n. 11, 2p.,1998.

TREVISAN, O.; PEREIRA, F.F.; CUSTODIO, R.A. **Constatação de atividade noturna de *Conotrachelus humeropictus* (Coleoptera: Curculionidae), broca dos frutos do cacau e do cupuaçu.** In: Congresso Brasileiro de Entomologia, Natal, RN. 2010.

TREVISAN, O. *et al.* **Manejo integrado das pragas do cacauzeiro do estado de Rondônia.** CEPLAC, Porto Velho, 2011.

TREVISAN, O. **Comportamento da broca dos frutos do cacau *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Col: Curculionidae) em Rondônia.** Dissertação de Mestrado em Entomologia. ESALQ, Piracicaba, 1989.

TRIGO, J.R., *et al.* **Ecologia química.** 2000. Disponível em: <<http://www.portalmedquimica.com.br/arquivos/article1.php.pdf>>. Acesso em: 08.11.2013.

TUMLINSON, J.H.; *et al.* **Sex pheromones produced by male boll weevil: Isolation, identification, and synthesis.** Science. v. 166, n. 3908, p. 1010-1012, 1969.

VENTURIERI, G.A. **Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos e processamento.** Belém: Clube do Cupu, p.108, 1993.

VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. **Introdução aos semioquímicos e terminologia.** In: VILELA E.F. & DELLA LUCIA, T.M.C. (eds.) Feromônio de insetos: biologia, química e aplicação. Ribeirão Preto: Holos, cap. 1, p. 9-12, 2001.

VILELA, E.F.; MAFRA-NETO, A. **Registro de feromônio comerciais legislação.** In: VILELA E.F. & DELLA LUCIA, T.M.C. (eds.) Feromônio de insetos: biologia, química e aplicação. Ribeirão Preto: Holos, cap. 19, p. 151-159, 2001.

ZARBIN, P.H.G. *et al.* **(1R,2S,6R)-2-Hydroxymethyl-2,6-dimethyl-3-oxabicyclo [4.2.0]octane, a new volatile released by males of papaya borer *Pseudopiazurus obesus* (Col.: Curculionidae).** Organic Letters. v. 12, n. 11, p. 2447-2449, 2010.

ZARBIN, P.H.G.; RODRIGUES, M.A.C.M. **Feromônios de insetos: tecnologias e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil.** Química Nova, v. 32, n. 3, p. 722-731, 2009.

ZARBIN, P.H.G. **Extração, isomlamento e identificação de substâncias voláteis de insetos.** In: VILELA E.F. & DELLA LUCIA, T.M.C. (eds.) Feromônio de insetos: biologia, química e aplicação. Ribeirão Preto: Holos, cap.5, p. 45-50, 2001.