

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELIANE DE OLIVEIRA BORGES

ECOLOGIA QUÍMICA, MORFOLOGIA E ETOLOGIA DAS BORBOLETAS *Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1775), *Heliconius ethilla narcaea* Godart, 1819, E *Heliconius besckei* Ménétriés, 1857 (NYMPHALIDAE: HELICONIINAE)

CURITIBA

2018

ELIANE DE OLIVEIRA BORGES

ECOLOGIA QUÍMICA, MORFOLOGIA E ETOLOGIA DAS BORBOLETAS *Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1775), *Heliconius ethilla narcaea* Godart, 1819, E *Heliconius besckei* Ménétriés, 1857 (NYMPHALIDAE: HELICONIINAE)

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

Orientador: Paulo Henrique Gorgatti Zarbin

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Borges, Eliane de Oliveira.

Ecologia química, morfologia e etologia das borboletas *Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1775), *Heliconius ethilla narcaea* Godart, 1819, e *Heliconius besckei* Ménétriés, 1857 (Nymphalidae: Heliconiinae). / Eliane de Oliveira Borges. – Curitiba, 2018.

202 f. : il. ; 30cm.

Orientador: Paulo Henrique Gorgatti Zarbin.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Entomologia).

1. Borboleta. 2. Ecologia química. 3. Glândulas Odoríferas. 4.

Passiflorácea. I. Título. II. Zarbin, Paulo Henrique Gorgatti. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Entomologia).

CDD (20. ed.) 595.7



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

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ENTOMOLOGIA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ELIANE DE OLIVEIRA BORGES** intitulada: *Ecologia química, morfologia e etologia das borboletas *Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1775), *Heliconius ethilla narcaea* Godart, 1819, e *Heliconius besckei* Ménétriés, 1857 (Nymphalidae: Heliconiinae)*, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

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

Curitiba, 30 de Novembro de 2018.

PAULO HENRIQUE GORGATTI ZARBIN  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

DIOGO MONTES VIDAL  
Avaliador Externo (UFMG)

JOSE HENRIQUE PEDROSA MACEDO  
Avaliador Externo (UFPR)

ERALDO RODRIGUES DE LIMA  
Avaliador Externo (UFV)

**Dedico este trabalho,**

ao meu filho Vinicius; foram muitas noites mal dormidas... Durante o dia a língua enrolava muitos não entendiam... E eu nem me importava, era só lembrar seu rostinho para querer outra noite igual. Você iluminou meus passos nesta caminhada. O trabalho foi árduo, e graças a você fiquei cada vez mais forte. Amo-te. E, ao meu companheiro José Attila, sem o qual nada teria se concretizado...

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Paulo Henrique Gorgatti Zarbin, pela orientação.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Entomologia e aos funcionários da UFPR.

Ao professor Gedir de Oliveira Santos do Programa de Pós-graduação em Botânica pela liberação do espaço para construção do insetário.

Em especial, à professora Mirna Martins Casagrande do Programa de Pós-graduação em Entomologia da UFPR pelo apoio.

Ao professor Ciro Oliveira Ribeiro do Programa de Pós-graduação em Biologia celular pelo apoio e parceria.

Aos professores Aldo Araújo e Gilson Rudinei Pires Moreira do Programa de Pós-graduação em Zoologia da UFRGS, pelo apoio.

Aos colegas do PPG Entomologia, pelas trocas valiosas e amizade.

Aos colegas químicos e biólogos, do Laboratório de Semioquímicos pela ajuda nos procedimentos com equipamentos, análises e amizade: Kátia, Camila, Douglas, Bruna, Diogo, Daiane, Rângela, Samara, Carla, Maycon e Antonioni.

Às demais pessoas que, anonimamente ou não, me incentivaram, apoiaram e que compartilharam alguma etapa desta jornada e que aqui não foram citadas.

À Capes, pelo apoio financeiro.

Às minhas irmãs Elvira e Elisa, portos seguros, nas idas e vindas.

À natureza desta terra abençoada, Brasil.

*Os Educadores-sonhadores jamais desistem de suas sementes, mesmo que não germinem no tempo certo... Mesmo que pareçam frágeis frente às intempéries... Mesmo que não sejam viçosas e que não exalem o perfume que se espera delas. O espírito de um mestre nunca se deixa abater pelas dificuldades. Ao contrário, esses educadores entendem experiências difíceis como desafios a serem vencidos.*

**Gabriel Chalita**

## RESUMO

Dentre os semioquímicos, os voláteis constitutivos e de defesa de *Passiflora edulis* e os feromônios afrodisíacos e antiafrodisíacos de *Heliconius erato phyllis*, *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei* são estudados devido às interações comportamentais, entre estes seres vivos, observadas em campo. *Passiflora edulis* é uma passiflorácea, planta hospedeira das borboletas foco deste estudo. Os heliconíneos interagem quimicamente através dos voláteis de secreções glandulares de órgãos produtores de odor, como as androcônias e as glândulas odoríferas abdominais. Considerando o exposto, o presente estudo apresenta os compostos químicos voláteis presentes nos *bouquets* odoríferos relacionados à defesa da planta contra o herbívoro, oviposição e dano mecânico, de atração sexual entre os lepidópteros, durante a corte e no acasalamento pupal, e de repulsão sexual de machos pelas fêmeas acasaladas. As implicações decorrentes da composição estrutural, similaridades e diferenças existentes nos *bouquets*, comportamentos observados e morfologia dos órgãos associados são analisadas à luz da ecologia química. A abordagem metodológica partiu de uma revisão bibliográfica sobre os temas abordados e consistiu em análises químicas de cromatografia em fase gasosa, cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas; análises morfológicas de microscopia óptica, eletrônica de varredura e de transmissão; análises comportamentais através de bioensaios; e análises eletroantegráficas. Como resultado, verificou-se que *P. edulis* emite principalmente terpenos, em maior quantidade, 24h após a herbivoria das larvas de *H. erato phyllis*. As glândulas odoríferas abdominais de *H. erato phyllis*, *H. ethilla narcaea* e *H. besckei* emitem (*E*)- $\beta$ -ocimeno o composto comum a estes lepidópteros, sendo potencialmente um composto antiafrodisíaco interespecífico. Em *H. erato phyllis* os voláteis são antiafrodisíacos e em *H. ethilla narcaea* e *H. besckei* não foi possível associa-los até a presente data à sua função através de bioensaios e análises eletroantegráficas. A análise morfológica da bolsa odorífera abdominal da fêmea dos heliconíneos estudados e a quantificação dos compostos químicos equivalente mostraram que devido ao tamanho e quantidade das cisternas ou tanques presentes nos lobos da bolsa, pode ocorrer um maior ou menor desempenho na função antiafrodisíaca. A análise morfológica da androcônia do macho e a quantificação dos compostos químicos mostraram que devido ao tamanho das escamas androconiais e quantidade de vesículas e espaços vazios no interior da escama, podem existir diferentes condições de armazenamento da secreção de feromônio que irão provavelmente interferir na função afrodisíaca.

**Palavras-chave:** Androcônia. Borboletas. Ecologia química. Glândulas odoríferas abdominais. Semioquímicos de plantas.



## ABSTRACT

Among the semiochemicals, the constitutive and defense volatiles of *Passiflora edulis* and the aphrodisiac and anti-aphrodisiac pheromones of *Heliconius erato phyllis*, *Heliconius ethilla narcaea* and *Heliconius besckei* are studied due to the behavioral interactions among these living beings observed in the field. *Passiflora edulis* is a host plant of the butterflies, the focus of this study. Heliconians interact chemically through the volatiles of glandular secretions of odor-producing organs, such as androconia and abdominal scent glands. Considering what has been stated above, the present study investigates the volatile chemical compounds found in the odoriferous bouquets related to plant defense against herbivores, oviposition and mechanical damage and to sexual attraction between Lepidoptera during pupal courtship and mating, and the sexual repulsion of males by mated females. The implications of structural composition, similarities and differences in the bouquets, observed behaviors and morphology of the associated organs are analyzed in the light of chemical ecology. The methodological approach was based on a bibliographical review of the topics in question and consisted of chemical analyses of gas chromatography, gas chromatography coupled with mass spectrometry, morphological analyses of light microscopy, scanning and transmission, behavioral analysis through bioassays and electroanthrenographic analysis. As a result, it was verified that *P. edulis* mainly emits terpenes, in greater quantity, 24h after the herbivory of the *H. erato Phyllis* larvae. The abdominal scent gland of *H. erato phyllis*, *H. ethilla narcaea* and *H. besckei* emit (*E*)- $\beta$ -ocimene, potentially being an interspecific anti-aphrodisiac compound. In *H. erato phyllis* the volatiles are anti-aphrodisiac and in *H. ethilla narcaea* and *H. besckei* it was not possible to associate them to date with their function through bioassays and electroanthrenographic analyzes. The morphological analysis of the abdominal odor sac of the female heliconians under study and the quantification of the equivalent chemical compounds showed that due to the size and quantity of the cisterns or tanks present in the pouch lobes, a greater or lesser performance in the anti-aphrodisiac function may occur. The morphological analysis of the male androconia and the quantification of the chemical compounds showed that due to the size of the androconia scales and the number of vesicles and voids within the scale, different storage conditions of the pheromone secretion may exist that will probably interfere with the aphrodisiac function.

**Keywords:** Abdominal odoriferous glands. Androconia. Butterflies. Chemical ecology. Plants semiochemicals.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- MAPA DO BRASIL MOSTRANDO ALGUNS ESTADOS E A REGIÃO DE OCORRÊNCIA COMUM (ÁREA EM AMARELO) DOS TRÊS LEPIDÓPTEROS ESTUDADOS. ....	23
FIGURA 2 - VISTA DORSAL (VD) E VISTA VENTRAL (VV), RESPECTIVAMENTE, DE MACHOS .....	25
FIGURA 3 - RAMOS DE <i>Passiflora edulis</i> E ESPÉCIMES DE <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	27
FIGURA 4 - RESUMO ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DA INTERAÇÃO PLANTA-INSETO.....	41
FIGURA 5 - MUDAS DE <i>Passiflora edulis</i> NÃO TRATADAS, E TRATADAS .....	43
FIGURA 6 - MUDAS DE <i>Passiflora edulis</i> TRATADAS E NÃO TRATADAS EM CÂMARAS DE AERAÇÃO .....	44
FIGURA 7 - A COLETA DE 1 $\mu$ L DO EXTRATO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA DE MASSAS.....	45
FIGURA 8 - COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DOS EXTRATOS VEGETAIS DE <i>Passiflora edulis</i> TRATADOS E CONTROLE .....	49
FIGURA 9 - COMPARAÇÕES ENTRE AS EMISSÕES DE COVS DE PLANTAS DE <i>Passiflora edulis</i> .....	51
FIGURA 10 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) .....	52
FIGURA 11 - RESULTADOS DE PCA, TESTE ANOVA, E DE TUKEY, QUE TESTARAM O BUQUÊ DE COVS EMITIDOS POR MUDAS DE <i>Passiflora edulis</i> .....	53
FIGURA 12- RESUMO ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DA ANDROCÔNIA DAS ASAS DOS LEPIDÓPTEROS .....	82
FIGURA 13 - RESUMO ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DO ACASALAMENTO PUPAL DOS LEPIDÓPTEROS.....	83

FIGURA 14 - DISSECAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES MORFOLÓGIAS E QUÍMICAS .....	84
FIGURA 15 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES MORFOLÓGIAS EM MICROSCÓPIO .....	85
FIGURA 16 – MICROEXTRAÇÃO POR FASE SÓLIDA (ETAPAS) .....	87
FIGURA 17 - LOCALIZAÇÃO DA ANDROCÔNIA .....	90
FIGURA 18 - MICROGRAFIAS DE MEV DE ESCAMAS ANDROCONIAIS DA ASA POSTERIOR DO MACHO .....	92
FIGURA 19 - IMAGENS DE MEV E MET DO CORTE TRANSVERSAL DA VEIA Sc + R1 DO MACHO .....	93
FIGURA 20 - MICROGRAFIAS DE MEV E MET DE ESCAMAS ANDROCONIAIS DO MACHO .....	95
FIGURA 21 - IMAGENS DE MEV DE CORTES FRONTAIS DA ESCAMA ANDROCONIAL DO MACHO DE <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	96
FIGURA 22 - IMAGENS DE MEV DE CORTES FRONTAIS DA ESCAMA ANDROCONIAL DO MACHO DE <i>Heliconius ethilla narcaea</i> .....	97
FIGURA 23 - IMAGENS DE MEV DE CORTES FRONTAIS DA ESCAMA ANDROCONIAL DO MACHO DE <i>Heliconius besckei</i> .....	98
FIGURA 24 - IMAGENS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DA ASA ANTERIOR E POSTERIOR DA FÊMEA E DO MACHO .....	100
FIGURA 25 - IMAGEM DE MO DE ESCAMA NÃO ANDROCONIAL E ESCAMA ANDROCONIAL .....	101
FIGURA 26 - COMPARAÇÃO ENTRE CROMATOGRAMAS DE EXTRATOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO.....	102
FIGURA 27 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS EXCITADOS de <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	107
FIGURA 28 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS NÃO EXCITADOS de <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	108

FIGURA 29 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS EXCITADOS E NÃO EXCITADOS de <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	109
FIGURA 30 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS EXCITADOS de <i>Heliconius ethilla narcaea</i> .....	110
FIGURA 31 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS NÃO EXCITADOS de <i>Heliconius ethilla narcaea</i> .....	111
FIGURA 32 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS EXCITADOS E NÃO EXCITADOS de <i>Heliconius ethilla narcaea</i> .....	112
FIGURA 33 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS EXCITADOS de <i>Heliconius besckei</i> .....	113
FIGURA 34 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS NÃO EXCITADOS de <i>Heliconius besckei</i> .....	114
FIGURA 35 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS EXCITADOS E NÃO EXCITADOS de <i>Heliconius besckei</i> .....	115
FIGURA 36 - GRÁFICOS DAS ANÁLISES DE PCA .....	116
FIGURA 37 - PUPAS DE MACHO (a1, a2) E FÊMEA (b1, b2) DE <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	117
FIGURA 38 - PUPAS DE MACHO (a1, a2) E FÊMEA (b1, b2) DE <i>Heliconius ethilla narcaea</i> .....	117
FIGURA 39 - IMAGENS DA PORÇÃO FINAL DA PUPA DE <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	118
FIGURA 40 - IMAGENS DA PORÇÃO FINAL DA PUPA DE <i>Heliconius ethilla narcaea</i> .....	118

FIGURA 41 - QUATRO MACHOS DE <i>Heliconius erato phyllis</i> REALIZAM A GUARDA PUPAL POUSADOS SOBRE A PUPA FÊMEA .....	119
FIGURA 42 - CROMATOGRAMAS DOS VOLÁTEIS OBTIDOS DAS PUPAS FÊMEA E MACHO DE <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	120
FIGURA 43 - RESUMO ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL .....	140
FIGURA 44 - BOLSA ODORÍFERA ABDOMINAL DA FÊMEA E VALVA DO MACHO DE <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	142
FIGURA 45 - BOLSA ODORÍFERA ABDOMINAL DA FÊMEA E VALVA DO MACHO DE <i>Heliconius ethilla narcaea</i> .....	143
FIGURA 46 - ETAPAS DOS BIONSAIOS.....	145
FIGURA 47 – MICROGRAFIAS (MEV) DA BOLSA ODORÍFERA ABDOMINAL DA FÊMEA. ....	148
FIGURA 48 – MICROGRAFIAS (MEV) DA VALVA DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL DO MACHO .....	150
FIGURA 49 – ELETROANTENOGRAMA COM RESPOSTAS DA ANTENA DA FÊMEA VIRGEM AO EXTRATO DAS GLÂNDULAS ODORÍFERAS ABDOMINAIS DO MACHO ACASALADO .....	152
FIGURA 50 - COMPARAÇÃO ENTRE CROMATOGRAMAS DOS EXTRATOS DAS VALVAS .....	154
FIGURA 51 - COMPARAÇÃO ENTRE CROMATOGRAMAS DOS EXTRATOS DA GOA DE <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	158
FIGURA 52 - COMPARAÇÃO ENTRE CROMATOGRAMAS DOS EXTRATOS DA GOA DE <i>Heliconius ethilla narcaea</i> .....	159
FIGURA 53 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL: DO MACHO ACASALADO E DA FÊMEA ACASALADA APÓS O ACASALAMENTO DE <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	162
FIGURA 54 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL: DO MACHO NÃO ACASALADO, E DO	

MACHO ACASALADO E DA FÊMEA ACASALADA APÓS O ACASALAMENTO DE <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	163
FIGURA 55 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL: DOS VALORES OBSERVADOS E ESTIMADOS PARA O MACHO NÃO ACASALADO (c) DE <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	164
FIGURA 56 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL: DO MACHO ACASALADO E DA FÊMEA ACASALADA APÓS O ACASALAMENTO DE <i>Heliconius ethilla narcaea</i> .....	165
FIGURA 57 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL: DO MACHO NÃO ACASALADO, E DO MACHO ACASALADO E DA FÊMEA ACASALADA APÓS O ACASALAMENTO DE <i>Heliconius ethilla narcaea</i> .....	166
FIGURA 58 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL: DOS VALORES OBSERVADOS E ESTIMADOS PARA O MACHO NÃO ACASALADO (c) DE <i>Heliconius ethilla narcaea</i> .....	167
FIGURA 59 - GRÁFICOS DA ANÁLISE DE PCA PARA MATURAÇÃO DA GOA DO MACHO DE <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	168
FIGURA 60 - GRÁFICOS DAS ANÁLISES DE PCA DAS QUANTIFICAÇÕES DOS COMPOSTOS DAS GOAs, ENTRE MACHO E FÊMEA ACASALADOS .....	169
FIGURA 61 - GRÁFICOS DAS ANÁLISES DE PCA DAS QUANTIFICAÇÕES DOS COMPOSTOS DAS GOAs, ENTRE MACHO NÃO ACASALADO, MACHO ACASALADO E FÊMEA ACASALADA .....	170
FIGURA 62- COMPARAÇÃO COM IMAGENS DO SACO ODORÍFERO ABDOMINAL DAS FÊMEAS .....	171
FIGURA 63 - GRÁFICO QUE MOSTRA O NÚMERO DE RESPOSTAS ELETROANTENOGRÁFICAS AO EXTRATO DAS GOAs DO MACHO DE <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	173
FIGURA 64 - COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NOS BIOENSAIOS – GOA DE <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	174

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO (média + EP) (ng) dos COVs EMITIDOS PELAS MUDAS DE <i>Passiflora edulis</i> POR 24h ÀS 72h DOS SEGUINTEs TRATAMENTOS: DANO MECÂNICO (DM), HERBIVORIA (HB) E OVIPOSIÇÃO (OV) DE <i>Heliconius erato phyllis</i> (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE) .....	48
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA ESCAMA ANDROCONIAL (ANDROCONIUM) EM <i>Heliconius</i> spp. ....	91
TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE OS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NA ANDROCÔNIA ALAR DE <i>Heliconius erato phyllis</i> , <i>Heliconius ethilla narcaea</i> E <i>Heliconius besckei</i> .....	103
TABELA 4 - COMPARAÇÃO ENTRE OS COMPOSTOS ENCONTRADOS NAS GLÂNDULAS ODORÍFERAS ABDOMINAIS DE <i>Heliconius erato phyllis</i> , <i>Heliconius ethilla narcaea</i> E <i>Heliconius besckei</i> .....	155

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - FÓRMULAS ESTRUTURAIS DE COMPOSTOS CITADOS NO TEXTO. ....	74
QUADRO 2 - FÓRMULAS ESTRUTURAIS DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	152
QUADRO 3 - FÓRMULAS ESTRUTURAIS DE COMPOSTOS NÃO BIOATIVOS PARCIALMENTE IDENTIFICADOS DE <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	153



## LISTA DE ABREVIATURAS

10Al	- Decanal
5HiOcta	- 5-hidroxi-4-octanona
9Al	- Nonanal
AA	- Asa anterior
AP	- Asa posterior e Alcaloide Pirrolidizínico
APs	- Alcaloides pirrolidizínicos
C	- Controle
CG	- Cromatografia em fase gasosa ou cromatógrafo gasoso
CG-EAD	- Cromatografia em fase gasosa acoplada à eletroantenografia
CG-EM	- Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
COVs	- Compostos orgânicos voláteis
DM	- Dano mecânico
DMNT	- ( <i>E</i> )-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno
EAD	- Detector eletroantegráfico (do inglês, <i>electroantennographic detector</i> )
EbCar	- ( <i>E</i> )- $\beta$ -cariofileno
EbFar	- ( <i>Z</i> )- $\beta$ -farneseno
EbOci	- ( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimeno
EIV	- Espectroscopia no infravermelho
EM	- Espectrometria de massas
EP	- Erro padrão
Far	- Farnesano
FID	- Detector de ionização de chama (do inglês, <i>flame ionization detector</i> )
GOAs	- Glândulas odoríferas abdominais
HB	- Herbivoria
IK	- Índice de Kovats
IR	- Índice de retenção

MA	- Macho acasalado
MET	- Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
MNA	- Macho não acasalado
MO	- Microscopia óptica
ng	- Nanogramas
OV	- Oviposição
PCA	- <i>Principal Component Analysis</i> (Análise de componentes principais)
SPME	- Microextração em fase sólida
TMTT	- (2 <i>E</i> ,7 <i>E</i> )-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno

## LISTA DE SÍMBOLOS

® - marca registrada

μ - micro

♂ - macho

♀ - fêmea

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	23
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	30
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	34
<b>CAPÍTULO I. A INTERAÇÃO QUÍMICA PLANTA-INSETO</b> .....	35
<b>RESUMO</b> .....	36
<b>ABSTRACT</b> .....	37
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	38
<b>1.2 OBJETIVOS</b> .....	40
1.2.1 O objetivo geral .....	40
1.2.2 Os objetivos específicos .....	40
<b>2 METODOLOGIA</b> .....	41
2.1 CRIAÇÃO DE <i>Heliconius erato phyllis</i> E CULTIVO DE MUDAS DE <i>Passiflora edulis</i> .....	41
2.2 SELEÇÃO DE MUDAS DE <i>P. edulis</i> E APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS ..	42
2.3 COLETA DOS VOLÁTEIS .....	43
2.4 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS .....	44
2.5 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS .....	45
2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	45
<b>3 RESULTADOS</b> .....	47
3.1 COVS DE <i>Passiflora edulis</i> : IDENTIFICAÇÃO, ANÁLISE E COMPARAÇÃO DE TRATAMENTOS .....	47
3.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	52
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58

	CAPÍTULO II. AS INTERAÇÕES QUÍMICAS INSETO-INSETO – FEROMÔNIOS AFRODISÍACOS (ANDROCÔNIA ALAR E ACASALAMENTO PUPAL) .....	64
	RESUMO .....	65
	ABSTRACT .....	66
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	67
1.1	ANDROCÔNIA.....	68
1.2	A GUARDA E O ACASALAMENTO PUPAL .....	79
<b>1.3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	81
1.3.1	O objetivo geral .....	81
1.3.2	Os objetivos específicos .....	81
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	82
2.1	CRIAÇÃO DE <i>Heliconius erato phyllis</i> , <i>Heliconius ethilla narcaea</i> e <i>Heliconius besckei</i> .....	83
2.2	MORFOLOGIA DAS ASAS .....	83
2.3	MORFOLOGIA DAS ESCAMAS ANDROCONIAIS .....	85
2.4	EXTRAÇÃO POR SOLVENTE .....	86
2.5	MICROEXTRAÇÃO POR FASE SÓLIDA (SPME) .....	87
2.6	ANÁLISES QUÍMICAS .....	87
2.7	IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS .....	88
2.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	88
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	89
3.1	ANDROCÔNIA .....	89
3.1.1	Morfologia .....	89
3.1.1.1	Localização das escamas androconiais .....	89
3.1.1.2	Morfologia externa da escama androconial da veia Sc+R1.....	90

3.1.1.3	Glândulas associadas .....	93
3.1.1.4	Morfologia interna do androconium .....	93
3.1.1.5	Diferenciação sexual através da faixa de sobreposição .....	99
3.1.2	Análises Químicas .....	101
3.1.2.1	Análise qualitativa inicial .....	101
3.1.2.2	Análise qualitativa pelo índice de retenção (Kovats) .....	102
3.1.2.2.1	Importância biológica .....	103
3.1.2.3	Análise quantitativa dos compostos nas androcônias de machos excitados e não excitados .....	105
3.1.2.4	Análises estatísticas .....	115
3.2	ACASALAMENTO PUPAL E GUARDA PRÉ-ACASALAMENTO .....	117
3.2.1	As pupas .....	117
3.2.2	Identificação de pupas macho e fêmea .....	118
3.2.3	O comportamento dos machos de ficar de guarda sobre pupas fêmeas .....	118
3.2.4	Voláteis encontrados na pupa macho e fêmea de <i>Heliconius erato phyllis</i> ....	119
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>121</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>124</b>
	CAPÍTULO III. AS INTERAÇÕES QUÍMICAS INSETO-INSETO – FEROMÔNIOS ANTIAFRODISÍACOS .....	132
	RESUMO .....	133
	ABSTRACT .....	135
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>136</b>
<b>1.2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>139</b>
1.2.1	O objetivo geral .....	139
1.2.2	Os objetivos específicos .....	139
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>140</b>

2.1	CRIAÇÃO DE <i>Heliconius erato Phyllis</i> , <i>Heliconius ethilla narcaea</i> e <i>Heliconius besckei</i> E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS .....	140
2.2	ANÁLISE MORFOLÓGICA .....	141
2.3	COLETA DAS AMOSTRAS .....	141
2.4	PROCEDIMENTOS QUÍMICOS .....	143
2.5	ANÁLISES ELETROANTENOGRÁFICAS .....	143
2.6	SÍNTESE E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIAFRODISÍACOS .....	144
2.7	BIOENSAIOS COMPORTAMENTAIS .....	144
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	145
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>147</b>
3.1	MORFOLOGIA .....	147
3.1.1	Fêmea .....	147
3.1.1.1	Saco odorífero abdominal .....	147
3.1.1.2	Cisternas ou tanques .....	148
3.1.2	Macho .....	149
3.1.2.1	Valva do macho .....	149
3.1.2.2	Extremidade afilada da superfície interna da valva .....	150
3.2	ANÁLISES QUÍMICAS .....	151
3.2.1	Análise qualitativa inicial .....	151
3.2.2	Análise qualitativa pelos índices de retenção e índice de Kovats .....	154
3.2.2.1	Importância biológica .....	156
3.2.3	Análise quantitativa inicial .....	158
3.2.4	Análise quantitativa dos compostos nas valvas dos machos não acasalados, machos acasalados e da bolsa odorífera abdominal da fêmea .....	160
3.2.5	Análises estatísticas .....	168
3.2.6	Análise sobre a morfologia das glândulas odoríferas abdominais e o armazenamento de compostos .....	171

3.2.7	Análises eletroantegráficas – <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	172
3.2.8	Bioensaios – <i>Heliconius erato phyllis</i> .....	173
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>175</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>178</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>181</b>
	<b>PROPOSTAS DE ESTUDO</b> .....	<b>181</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>183</b>
	<b>APÊNDICE 1 – TABELAS COMPLEMENTARES</b> .....	<b>199</b>
	<b>APÊNDICE 2 - LICENÇAS EDITORIAIS</b> .....	<b>202</b>



## INTRODUÇÃO GERAL

As informações químicas presentes nas relações entre planta-inseto e inseto-inseto podem ser evidenciadas nas interações comportamentais observáveis. Entre lepidópteros coespecíficos e heteroespecíficos podem ser observadas interações, por exemplo, em voos de aproximação e afastamento, alternados por longo período de tempo ou não, aproximação em situações em que um espécime heteroespecífico ou coespecífico é confinado, ou em situações associadas à reprodução, etc. A existência dos infoquímicos atuando na comunicação entre plantas e lepidópteros, pode ser observada, por exemplo, na aproximação durante a alimentação quando o lepidóptero procura pólen e néctar de flores, na oviposição, etc. Nas pesquisas que envolvem a etologia, os comportamentos geralmente são analisados em ambientes monitorados e de confinamento (como por exemplo em: GRÖNING & HOCHKIRCH, 2008; NIEBERDING *et al.*, 2008; CRUZ & EIZAGUIRRE, 2015). Foram observados comportamentos interativos entre as borboletas foco deste estudo, em condições naturais de campo. Os lepidópteros estudados ocupam uma grande área em comum da Mata Atlântica, Brasil (Parte do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo) (ROSSER *et al.*, 2012) (FIGURA 1).

FIGURA 1 - MAPA DO BRASIL MOSTRANDO ALGUNS ESTADOS E A REGIÃO DE OCORRÊNCIA COMUM (ÁREA PONTILHADA) DOS TRÊS LEPIDÓPTEROS ESTUDADOS



FONTE: Adaptado de Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), 2017; e de Rosser *et al.*, 2012 (área em amarelo).

Após a observação dos comportamentos de interação, procuraram-se evidências de interações químicas entre estes insetos, e entre estes e o meio

ambiente, obtendo-se primeiramente uma visão macroscópica do cenário para posteriormente distinguirem-se as relações químicas.

Estas últimas inicialmente ocultas e muitas vezes imperceptíveis aos seres humanos, mas não por isso menos importantes. Verifica-se que muitas das funções vitais dos insetos ocorrem graças aos compostos orgânicos voláteis (COVs) que quando emitidos vão sinalizar a fonte alimentar, a localização de possíveis companheiros sexuais, permitir a defesa contra inimigos, o reconhecimento de coespecíficos e heteroespecíficos e emitir sinais de alerta e de perigo (ZARBIN *et al.*, 2009; SILVA *et al.* 2012). Os voláteis, quando chegam aos destinatários, podem desencadear respostas funcionais que permitirão uma comunicação mais eficiente. E, podem atingir também outros indivíduos, coespecíficos ou heteroespecíficos, já que o número de indivíduos que se relacionam num ecossistema varia consideravelmente dependendo da área em estudo (CORREIA & OLIVEIRA, 2000).

As matas remanescentes do bioma brasileiro Mata Atlântica são representadas por uma vegetação característica presente desde a região sul até o nordeste do Brasil (REGINATO *et al.*, 2008), onde encontra-se uma grande variedade de lepidópteros que possuem um papel importante na polinização e como bioindicadores (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Dentro deste panorama em uma área representativa de Mata Atlântica, a reserva biológica Mata Viva (REGINATO *et al.*, 2008), localizada no Campus Politécnico (CP) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, encontra-se uma amostra significativa de lepidópteros e suas respectivas plantas hospedeiras. Dentre as famílias de lepidópteros encontradas destaca-se a família Nymphalidae que é composta por borboletas especialistas, com cerca de 6000 espécies descritas até agora. Algumas sinapomorfias da família Nymphalidae são relevantes, como a presença de ranhuras alongadas (carenas) ao longo da parte inferior de todos os segmentos das antenas e por terem o primeiro par de pernas atrofiadas (constituindo "pernas de limpeza" particularmente nos machos) na forma de pequenas escovas. Assim sendo as borboletas da família Nymphalidae se apoiam sobre quatro pernas e seus representantes são frequentemente chamados de borboletas *brush footed* (WAHLBERG & BROWER, 2009). Pertencentes à família Nymphalidae, *Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1775), *Heliconius ethilla narcaea* Godart, 1819, e *Heliconius besckei* Ménétrés, 1857 (Nymphalidae, Heliconiinae; Heliconiini) (FIGURA 2), apresentam comportamento interativo em observações de campo e foram, portanto, escolhidas como objetos deste estudo.

FIGURA 2. VISTA DORSAL (vd) E VISTA VENTRAL (vv), RESPECTIVAMENTE, DE MACHOS DE (1A) *Heliconius erato phyllis*, (1B) *Heliconius ethilla narcaea* e (1C) *Heliconius besckei*. BARRA = 10 mm



FONTE: O autor (2016).

*Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1775) é amplamente distribuída na América do Sul, onde ocorre desde o Nordeste até o Sul do Brasil, Bolívia, nordeste da Argentina, Uruguai e Paraguai (HOLZINGER & HOLZINGER, 1994). A subespécie apresenta a cor preta de fundo das asas, com uma faixa vermelha, nas asas anteriores, e uma faixa amarela, mais delgada, nas posteriores. Nas asas posteriores, na região ventral e basal, existem manchas vermelhas (HOLZINGER & HOLZINGER, 1994), com variação sazonal entre uma a sete, consideradas como polifenismo numérico em estudo realizado em diferentes regiões do estado de São Paulo (RAMOS & FREITAS, 1999). *Heliconius ethilla narcaea* Godart, 1819, são encontradas no Brasil (Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). A cor básica das asas está entre o laranja e o amarelo. A asa anterior tem uma linha amarela mediana e contínua. A área apical é preta com uma grande superfície branca oval subapical. A asa posterior tem um cinto preto médio e

moderadamente amplo. *Heliconius besckei* Ménériés, 1857, ocorre no Brasil (Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, registros em Goiás e Brasília), Argentina (acima do rio Uruguai) e Bolívia (Santa Cruz de La Sierra). A cor básica das asas está entre o preto e o marrom escuro. A asa anterior possui uma faixa vermelha larga. Na extremidade proximal desta tira, um ponto amarelo. Asa posterior com uma faixa amarela transversal e, no fundo, uma linha vermelha paralela à margem anal da asa (HOLZINGER & HOLZINGER, 1994). Foram relatadas ocorrências na Bahia (CARDOSO, 2005).

Tais lepidópteros conhecidos como borboletas do maracujá (BROWN JR. & MIELKE, 1972; BIANCHI & MOREIRA, 2005), utilizam passifloráceas para alimentação das larvas e oviposição (BENSON *et al.*, 1976) (FIGURA 3). O gênero *Passiflora* é o maior gênero da família Passifloraceae, também conhecido como gênero da flor da paixão, do fruto da paixão e da videira da paixão (EUA). É composto por 525 espécies diferentes e é encontrado na China, sul da Ásia, América do Sul e Nova Guiné (BERRY, 2018). *Passiflora actinia* Hooke, 1943, é a planta hospedeira encontrada no ambiente natural dos lepidópteros e *Passiflora edulis* Sims, 1818, (FIGURA 2) a espécie utilizada para estudo da interação planta-inseto; visto que, as preferências alimentares induzidas nas larvas de *Heliconius*, não são limitadas pelo desempenho e pela filogenia da planta hospedeira (SILVA *et al.*, 2014).

FIGURA 3 - RAMOS DE *Passiflora edulis* E ESPÉCIMES DE *Heliconius erato phyllis*.

FONTE: O autor (2017).

Por definição a ecologia química é a ciência que estuda a comunicação entre os seres vivos a partir dos semioquímicos. Os semioquímicos, produtos químicos bioativos, são produzidos pelos seres vivos em estruturas especializadas e são denominados de feromônios e aleloquímicos, infoquímicos intraespecíficos e interespecíficos respectivamente. Os semioquímicos interespecíficos poderão determinar um comportamento vantajoso para o emissor (alomônios), para o receptor (caiomônios) ou para ambos (sinomônios). Já os intraespecíficos são divididos em feromônios sexuais, de trilha, agregação, alarme, dispersão, ataque, entre outros (FERREIRA & ZARBIN, 1998; ZARBIN *et al.*, 1999; ZARBIN, 2014). Delimitados os objetos de estudo passou-se a buscar as possíveis relações químicas, utilizando-se os conceitos e ferramentas da ecologia química e conhecimentos sobre as plantas hospedeiras e a etologia dos lepidópteros.



As passifloráceas, assim como as demais plantas, defendem-se, reproduzem-se e espalham seus descendentes e para isso desenvolveram formas complexas de evolução e de interação com o meio ambiente. Nas interações em uma comunidade de plantas, os integrantes competem e se comunicam entre si (PIERIK, 2014) através dos voláteis químicos de comunicação intraespecífica e interespecífica. Com os outros seres vivos esta interação pode ser danosa ou benéfica, ou seja, alguns seres vivos fazem com que a maquinaria de defesa da planta seja ativada contra eles, e outros propiciam a polinização, a dispersão de sementes, a defesa contra outros seres vivos, etc. (PIERICK *et al.*, 2014). As defesas das plantas podem ser diretas por meio de pelos, espinhos, toxinas, redutores de digestão, e/ou voláteis; e defesas indiretas através do fornecimento de fontes alimentares ou produção de substâncias voláteis atraentes de inimigos de herbívoros (PINTO-ZEVALLOS *et al.*, 2013). Neste cenário os voláteis desempenham um papel crucial nas interações, dissuadindo herbívoros, atraindo polinizadores, dispersores de sementes e/ou inimigos carnívoros de herbívoros (PIERIK *et al.*, 2014). Os semioquímicos, em especial nas plantas, apresentam-se como substâncias do metabolismo secundário que, na maioria das vezes, relacionam-se com a defesa (PRICE, 1984), podendo estar envolvidas na interação entre as plantas e com o segundo ou terceiro nível trófico, atuando como alomônios, cairomônios ou sinomônios, dependendo do contexto ecológico.

Já os lepidópteros, mais especificamente as mariposas (Divisão Heterocera), são muito estudados em ecologia química devido ao fato de existirem muitas espécies pragas da agricultura, como por exemplo, as larvas de mariposas da família Noctuidae (HORAS *et al.*, 2014). Assim conhecendo-se os feromônios sexuais ou de agregação de uma espécie, por exemplo, pode-se montar armadilhas que irão atrair e aprisionar adultos, inviabilizando-se sua reprodução. As borboletas (Divisão Rhopalocera) são bastante utilizadas como modelos experimentais, como fonte de dados para avaliações taxonômicas, entre outros. Em ecologia química são investigadas devido a sua importância como causadoras de danos à agricultura, polinizadoras e bioindicadoras. Algumas espécies causam sérios prejuízos ao cultivo de *P. edulis*, que produz o maracujá amarelo, cujo maior produtor mundial é o Brasil (AGRIANUAL, 2017), sendo consideradas pragas (OLIVEIRA, 1989). A maioria das espécies-praga do maracujazeiro pertence à família Nymphalidae (ROSSETTO *et al.*, 1974) que o utilizam para oviposição e alimentação das larvas (BROWN JR. & MIELKE, 1972; BIANCHI & MOREIRA, 2005). As espécies mais danosas ao cultivo do maracujá amarelo são:

*Dione juno juno* Cramer, 1779 e *Agraulis vanillae vanillae* Linnaeus, 1758 (ROSSETTO *et al.*, 1974; FADINI & SANTA-CECÍLIA, 2000; AGUIAR-MENEZES *et al.*, 2002; FANCELLI & ALMEIDA, 2002). Já as borboletas do maracujá do gênero *Heliconius* Kluk, 1802, apresentam como características de interesse para a ecologia química, o acasalamento pupal, a ocorrência de androcônia (escamas odoríferas) no macho, a transferência de *bouquet* antiafrodisíaco do macho para a fêmea durante o acasalamento, entre outras.

Assim foram elaboradas as seguintes questões, que o presente estudo procurou responder:

1. A atividade dos lepidópteros induz a produção de compostos orgânicos voláteis pela planta hospedeira?
2. A glândula odorífera abdominal, a androcônia alar e pupas dos lepidópteros produzem feromônios?
3. A análise destes compostos permitirá estabelecer semelhanças e diferenças químicas entre as estruturas estudadas dos lepidópteros e entre estas estruturas e a planta hospedeira, que permitirão inferir sobre sua interação na natureza?

Portanto, a importância do presente trabalho está no fato de acrescentar dados novos e relevantes para a ecologia química, que ressaltam a importância da preservação do meio ambiente e dos lepidópteros existentes. Estudos sobre a ecologia química dos heliconíneos foco deste trabalho podem servir de modelo sustentável para estudos em espécies que atualmente causam grandes prejuízos para o plantio de passifloráceas e como parâmetro para estabelecimento de relações taxonômicas entre as espécies.

A presente tese será estruturada em três capítulos, devido a complexidade de cada tópico estudado. No capítulo I, a interação química planta-inseto, onde estabeleceu-se como interações a serem investigadas, a emissão de voláteis pela planta hospedeira *P. edulis* após a herbivoria e a oviposição de *H. erato phyllis*, após dano mecânico e emitidos pelas plantas controle. No capítulo II, as interações químicas inseto-inseto – feromônios afrodisíacos, onde foi analisada a emissão de feromônios afrodisíacos pela androcônia alar dos machos e pelas pupas fêmeas. E no capítulo III, as interações químicas inseto-inseto – feromônios antiafrodisíacos, onde foi estudada a emissão de feromônios antiafrodisíacos pelas glândulas odoríferas abdominais dos lepidópteros.

Deste modo o objetivo geral do presente estudo é conhecer as interações planta-inseto e inseto-inseto relacionados à *H. erato phyllis*, *H. ethylla narcaea*, *H. besckei* e *Passiflora edulis*, e determinar os compostos químicos, morfologia e etologia relacionados, que permitem estas relações.



## REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira. Maracujá.** São Paulo: FNP, Consultoria e Agro informativos, p. 345, 2017.
- AGUIAR-MENEZES, E. L.; MENEZES, E. B.; CASSINO, P. C. R.; SOARES, M. A. Passion fruit. In: PEÑA, J. L.; Sharp, J. L.; Wysoki, M. (Ed.). **Tropical fruit pests and pollinators: economic importance, natural enemies and control.** Nova York: CAB International, p. 361–390, 2002.
- BENSON, W. W.; BROWN, K. S. J.; GILBERT, L. E. Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. **Evolution**, n. 29, p. 659–680, 1976.
- BERRY, P. E. **Passifloraceae plant family.** British Encyclopedia, 2018. Disponível em <https://www.britannica.com/plant/Passifloraceae>. Acesso em 17/09/2018.
- BIANCHI, V.; MOREIRA, G. R. P. Preferência alimentar, efeito da planta hospedeira e da densidade larval na sobrevivência e desenvolvimento de *Dione juno juno* (Cramer,) (Lepidoptera, Nymphalidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, n. 22, v. 1, p. 43–50, 2005.
- BROWN, J. R. K. S.; MIELKE, O. H. H. The Heliconians of Brazil (Lepidoptera: Nymphalidae). Part II. Introduction and General Comments, with a supplementary Revision of the Tribe. **Zoologica**, New York, n. 57, p. 1–40, 1972.
- CARDOSO, M. Z. New for *Heliconius besckei* Ménétríés and *Heliconius sara* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae) in Bahia, Brazil. **Neotropical Entomology** n. 34, v. 6, p. 1007–1008, 2005.
- CORREIA, M. E. F.; OLIVEIRA, L. C. M. **Fauna de Solo: Aspectos Gerais e Metodológicos.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p. 46, 2000.
- CRUZ, D.; EIZAGUIRRE, M. Response to conspecific and heterospecific semiochemicals by *Sesamia nonagrioides* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae) gravid females. **Bulletin of Entomological Research**, p. 1–8, 2015.
- FADINI, M. A. M.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C. Manejo integrado de pragas do maracujazeiro. **Informe Agropecuário**, n. 21, v. 206, p. 29–33, 2000.
- FANCELLI, M.; DE ALMEIDA A. Insetos-praga e seu controle. In: LIMA, A. de A. (Ed.). **Maracujá - Produção: aspectos técnicos.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, c. 10, p. 57–66, 2002.
- FERREIRA, J. T. B.; ZARBIN, P. H. G. Amor ao primeiro odor: A comunicação química entre os insetos. **Quím. Nova na Escola**, n. 2, v. 7, p. 3–6, 1998.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica, no período de 2016 a 2017.** Relatório técnico, 2018. Disponível em [http://mapas.sosma.org.br/site\\_media/download/Atlas\\_Mata\\_Atlantica\\_2016-2017\\_relatorio\\_tecnico\\_2018\\_final.pdf](http://mapas.sosma.org.br/site_media/download/Atlas_Mata_Atlantica_2016-2017_relatorio_tecnico_2018_final.pdf). Acesso em 20/10/2018.
- GRÖNING, J.; HOCHKIRCH, A. Reproductive interference between animal species. **The Quarterly Review of Biology**, n.83, v.3, p. 257-282, 2008.
- HOLZINGER, H.; HOLZINGER, R. *Heliconius* and related genera. Venette, **Sciences Naturelles**, p. 328, 1994.

HORAS, V. R.; SILVA, M. A. N.; ANNIES, V.; MAIA, B. H. L. N. S.; MARQUES, F. A.; SILVA, M. F. G. F. Noctuidae- induced plant volatiles: current situation and prospects. **Química Nova**, n. 37, v. 10, p. 1663–1669, 2014.

NIEBERDING, C. M.; DE VOS, H.; SCHNEIDER, M. V.; LASSANCE, J. M.; ESTRAMIL, N. *et al.* The Male Sex Pheromone of the butterfly *Bicyclus anynana*: Towards an evolutionary analysis. **Public Library of Science**, one, n. 3, v. 7, p. e2751, 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002751>

OLIVEIRA, M. A. D. E.; GOMES C. F. F.; PIRES, E. M.; MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M. C. Bioindicadores ambientais: insetos como um instrumento desta avaliação. **Revista Ceres**, v. 61, supl. Viçosa, Nov./Dec., 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201461000005>

OLIVEIRA, Z. P. **A cultura do maracujazeiro: práticas de cultivo**. Maceió: **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Alagoas**, v. 1, p. 25, 1989.

PIERIK, R.; BALLARÉ, C. L.; DICKE, M. Ecology of plant volatiles: taking a plant community perspective. **Plant, Cell & Environment**, n. 37, p. 1845–1853, 2014.

PINTO-ZEVALLOS, D. M. P.; MARTINS, C. B. C.; PELLEGRINO, ZARBIN A. C.; P. H. G. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**, n. 36, v. 9, p. 1395-1405, 2013.

PRICE, P. W. **Insect Ecology**. New York, Wiley-Interscience, p. 607, 1984.

RAMOS, R. R.; FREITAS A. V. L. Population biology and wing color variation in *Heliconius erato phyllis* (Nymphalidae). **Journal of the Lepidopterists' Society**, N. 53, v. 1, p. 11–21, 1999.

REGINATO, M.; MATOS, F. B.; LINDOSO, G. DA S.; DE SOUZA, C. M. F.; PREVEDELLO, J. A.; MORAIS, J. W.; EVANGELISTA, P. H. L. A vegetação na Reserva Mata Viva, Curitiba, Paraná, Brasil. **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, n. 37, v. 3 e 4, p. 229–252, 2008.

ROSSER, N.; PHILLIMORE, A. B.; HUERTAS, B.; WILLMOTT, K. R.; MALLETT, J. Testing historical explanations for gradients in species richness in heliconiine species of tropical America. **Biological Journal of the Linnean Society**, n. 105, p. 479-497, 2012.

ROSSETTO, C. J.; CAVALCANTE, R. D.; GRISI JÚNIOR, C.; CARVALHO, A. M. Insetos do maracujazeiro, Passiflora spp. In: **Simpósio sobre a cultura do maracujá**, n. 1, Campinas, Anais, SBF/CATI, 1974.

SILVA, A. G.; SOUZA B. H. S.; RODRIGUES N. E. L.; BOTTEGA D. B., BOIÇA JUNIOR A. L. Interação tritrófica: aspectos gerais e suas implicações no manejo integrado de pragas. **Nucleus**, n. 9, p. 1, 2012.

SILVA, A. K.; GONCALVES, G. L.; MOREIRA, G. R. P. Larval feeding choices in heliconians: induced preferences are not constrained by performance and host plant phylogeny. **Animal Behaviour**, n. 89, p. 155-162, 2014.

WAHLBERG, N.; BROWER, A. V. Z. **The Tree of Life Web Project, Nymphalidae, Rafinesque 1815**. Brush-footed butterflies, 2009. Disponível em <http://tolweb.org/Nymphalidae/12172/2009.09.15> Acesso em 27/09/2017.

ZARBIN, P. H. G. **Ecologia química e o sistema de interação na natureza**. 2014. Disponível em <https://www.youtube.com/watch?v=QeXYi5HZXIs>. Acessado em 18/09/2108.

ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA J. T. B.; LEAL W. S. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Química Nova**, n. 22, p. 263–268, 1999.

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

## APRESENTAÇÃO

A presente tese de Doutorado está dividida em três capítulos:

CAPÍTULO I. AS INTERAÇÕES QUÍMICAS PLANTA-INSETO

CAPÍTULO II. AS INTERAÇÕES QUÍMICAS INSETO-INSETO – FEROMÔNIOS AFRODISÍACOS, (ANDROCÔNIA ALAR E ACASALAMENTO PUPAL)

CAPÍTULO III. AS INTERAÇÕES QUÍMICAS INSETO-INSETO – FEROMÔNIOS ANTIAFRODISÍACOS

## Capítulo I. AS INTERAÇÕES QUÍMICAS PLANTA-INSETO

## RESUMO

CAPÍTULO I. Os compostos orgânicos voláteis (COVs) constitutivos e de defesa de *Passiflora edulis* são estudados com base na sua importância quando emitidos na oviposição e herbivoria de lepidópteros. Os voláteis podem atrair predadores das larvas e ativar respostas em outros organismos, incluindo plantas coespecíficas. *Heliconius erato phyllis* foi a subespécie escolhida como modelo para este estudo devido ao seu fácil manejo e porque larvas de lepidópteros não selecionam fontes alimentares pela performance ou filogenia da planta hospedeira. E, apesar de não ser praga da cultura, a compreensão dos mecanismos de controle ecológico desta subespécie pode fornecer meios de controle mais adequados e sustentáveis para outras espécies danosas. Diante disso, o presente estudo apresenta os compostos químicos voláteis presentes nos *bouquets* odoríferos relacionados à defesa da planta contra o herbívoro, oviposição e dano mecânico. As implicações decorrentes da composição estrutural, similaridades e diferenças existentes nos *bouquets*, são analisadas à luz da ecologia química. A abordagem metodológica partiu de uma revisão bibliográfica sobre os temas abordados e consistiu em análises químicas de cromatografia em fase gasosa, cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, de voláteis emitidos por mudas de *P. edulis* submetidas aos tratamentos e não submetidas, mantidas em câmaras de aeração. Como resultado, verificou-se que *P. edulis* emite os compostos: (*E*)- $\beta$ -ocimeno, DMNT, farneseno, (*E*)- $\beta$ -cariofileno, (*Z*)- $\beta$ -farneseno, TMTT, em maior quantidade 24h após a herbivoria pelas larvas de *H. erato phyllis*. O composto (*E*)- $\beta$ -ocimeno foi um composto encontrado nos *bouquets* odoríferos das glândulas odoríferas abdominais dos heliconíneos aqui estudados, portanto sendo considerado potencialmente um composto antifrodisiaco interespecífico retirado da planta hospedeira.

Palavras-chave: Defesa de plantas contra herbívoros. Ecologia química.

## ABSTRACT

CHAPTER I. The constitutive volatile organic compounds (VOCs) and defense of *Passiflora edulis* plants are studied based on their importance when emitted in the oviposition and herbivory of Lepidoptera. Volatiles can attract larvae predators and activate responses in other organisms, including co-specific plants. *Heliconius erato phyllis* was the subspecies chosen as the model for this study due to its easy handling and because lepidopteran larvae do not prefer certain food sources due to the performance or phylogeny of the host plant. Although it is not a crop pest, understanding the ecological control mechanisms of this subspecies may provide more adequate and sustainable means of control for other, more harmful, species. Therefore, the present study investigates the volatile chemical compounds found in odoriferous bouquets related to plant defense against herbivores, oviposition and mechanical damage. The implications of structural composition and similarities and differences in bouquets are analyzed in the light of chemical ecology. The methodological approach was based on a bibliographical review of the topics in question and consisted of chemical analyzes of gas chromatography, gas chromatography coupled with mass spectrometry, volatiles emitted by *P. edulis* seedlings submitted and not submitted to treatments, kept in aeration chambers. As a result, *P. edulis* was found to emit the following compounds: (*E*)- $\beta$ -ocimene, DMNT, farnesene, (*E*)- $\beta$ -caryophyllene, (*Z*)- $\beta$ -farnesene, TMTT, in a larger quantity 24 h after herbivory by *H. erato phyllis* larvae. The compound (*E*)- $\beta$ -ocimene was a compound found in the odoriferous bouquets of the abdominal scent glands of the heliconians under study, thus being potentially considered an interspecific anti-aphrodisiac compound withdrawn from the host plant.

Keywords: Defense of plants against herbivores. Chemical ecology.

## 1 INTRODUÇÃO

Na natureza as plantas raramente ocorrem isoladas; (PIERIK, 2014). Por serem sésseis, estas plantas são dependentes de animais e outros seres vivos para sua defesa e reprodução (SCHOONHOVEN *et al.*, 2005; PIERIK, 2014). Assim se desenvolveram formas complexas de evolução e de interação com o meio ambiente (PIERIK, 2014), onde os voláteis produzidos pelas plantas desempenham um papel crucial (SCHOONHOVEN *et al.*, 2005; DICKE & LORETO, 2010; BRUCE & PICKETT, 2011; PINTO-ZEVALLOS *et al.*, 2013).

Os voláteis de plantas podem ser induzidos pelos insetos basicamente por oviposição ou herbivoria. Quando uma planta sofre a ação de um herbívoro, outros seres vivos presentes no meio ambiente podem responder aos voláteis de planta emitidos (PINTO-ZEVALLOS *et al.*, 2013). Os compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por plantas em resposta a herbivoria podem atrair os inimigos do herbívoro (ARIMURA *et al.*, 2009; PINTO-ZEVALLOS *et al.*, 2013) e podem ativar respostas em plantas coespecíficas e outros organismos, por exemplo, atraindo ou repelindo fêmeas de lepidópteros para oviposição (DE MORAES *et al.*, 2001; ZAKIR *et al.*, 2013), atraindo carnívoros de segundo nível trófico e polinizadores (DICKE & BALDWIN, 2010), e são emitidos quando a herbivoria ocorre tanto acima quanto abaixo do solo (RASMANN *et al.*, 2005; DICKE & BALDWIN, 2010). Nas plantas, a oviposição por insetos herbívoros promove a emissão de sinais voláteis, a formação de tecidos necróticos e produção de substâncias ovicidas (HILKER & MEINERS, 2006). Na literatura, vários estudos investigam a produção de compostos orgânicos voláteis pelas plantas por herbivoria e/ou oviposição por lepidópteros (PARÉ & TUMLINSON, 1999; FATOUROS *et al.*, 2012; ZAKIR *et al.*, 2013; HORAS *et al.*, 2014; HATANO *et al.*, 2015). Muitas plantas são capazes de discriminar entre os danos causados por insetos herbívoros ou danos mecânicos pelo reconhecimento de elicitores presentes nas secreções orais dos herbívoros e avaliar a quantidade e qualidade do dano tecidual, através do padrão, frequência e período de alimentação por herbívoros (WU & BALDWIN, 2009).

As plantas da família Passifloraceae são as plantas hospedeiras dos heliconíneos, uma coevolução que remonta ao pré-Cretáceo (EHRlich & HAVEN, 1964). As plantas ancestrais desenvolveram diferentes estratégias contra os herbívoros e, assim as borboletas Heliconiinae superaram essas barreiras, entraram em uma zona de adaptação livre de competidores, tornando-se especialistas (SMILEY, 1985a;



EHRlich & RAVEN, 1964). As estratégias criadas pelas passifloráceas em resposta à herbivoria em Heliconiinae incluem produção de compostos tóxicos e repelentes (SPENCER, 1988; BENSON *et al.*, 1976), modificações estruturais, que podem desencorajar ou prevenir a oviposição (WILLIAMS & GILBERT, 1981; GILBERT, 1982, 1991), perfuração de larvas (GILBERT, 1971) e atração de formigas predadoras (GILBERT, 1975; SMILEY, 1985b). Algumas das respostas de Heliconiinae para superar as defesas das plantas são: A preferência por ovipositar no ápice de gavinhas evitando a predação das formigas, a habilidade das larvas para revestir tricomas com seda para evitar a perfuração da cutícula e habilidades de visão e memória, que podem ajudar as borboletas a encontrar e selecionar plantas hospedeiras (BENSON *et al.*, 1976). Lepidópteros da divisão de Heterocera, as mariposas, geralmente utilizam compostos recentemente sintetizados para produzir sinais voláteis. A divisão de Rhopalocera, composta pelas borboletas, em contraste, utilizam frequentemente substâncias químicas retiradas de plantas para produzir odores (BOPPRÉ, 1984; SCHULZ *et al.*, 2004). Estes compostos capturados a partir de plantas são utilizados na composição de substâncias de defesa e feromônios.

*Passiflora edulis* produz o maracujá amarelo e é a planta hospedeira de várias espécies de borboletas Nymphalidae, conhecidas como borboletas do maracujá (BROWN JR. & MIELKE, 1972; BIANCHI & MOREIRA, 2005), comuns das plantações de maracujá no Brasil (ROSSETTO *et al.*, 1974). *Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Nymphalidae) utiliza maracujazeiros para oviposição e como fonte de alimentação das larvas (BENSON *et al.*, 1976). Larvas de *Heliconius erato phyllis*, não possuem implicações com a baixa produtividade nas plantações de maracujazeiros. Apesar deste fato, o presente trabalho pode fornecer um modelo de obtenção de meios mais adequados de tratamento de problemas relacionados a danos à cultura do maracujá amarelo causados pelas espécies danosas, de uma maneira mais sustentável.

Dentro deste contexto, o presente capítulo tem como objetivo geral apresentar os voláteis constitutivos de *P. edulis*, na planta sadia, os voláteis induzidos por herbivoria e oviposição de *H. erato phyllis*, bem como fornecer um modelo sustentável de obtenção de dados de ecologia química para futura aplicação no manejo integrado de pragas.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Investigar a composição química dos voláteis de *Passiflora edulis* emitidos por plantas sem tratamento (controle) e submetidos à herbivoria e oviposição de *Heliconius erato phyllis* e a danos mecânicos; e suas possíveis implicações como constituintes dos feromônios dos lepidópteros.

### 1.2.2 Os objetivos específicos

Coletar, extrair e identificar COVs de *Passiflora edulis*.

Determinar os voláteis emitidos pela planta sem tratamento.

Determinar os voláteis induzidos por herbivoria, oviposição (*H. erato phyllis*) e danos mecânicos.

Quantificar os compostos voláteis nas diferentes condições determinadas (controle, danos mecânicos, herbivoria e oviposição).

Determinar qual ou quais tratamentos são responsáveis pela comunicação de defesa da planta.

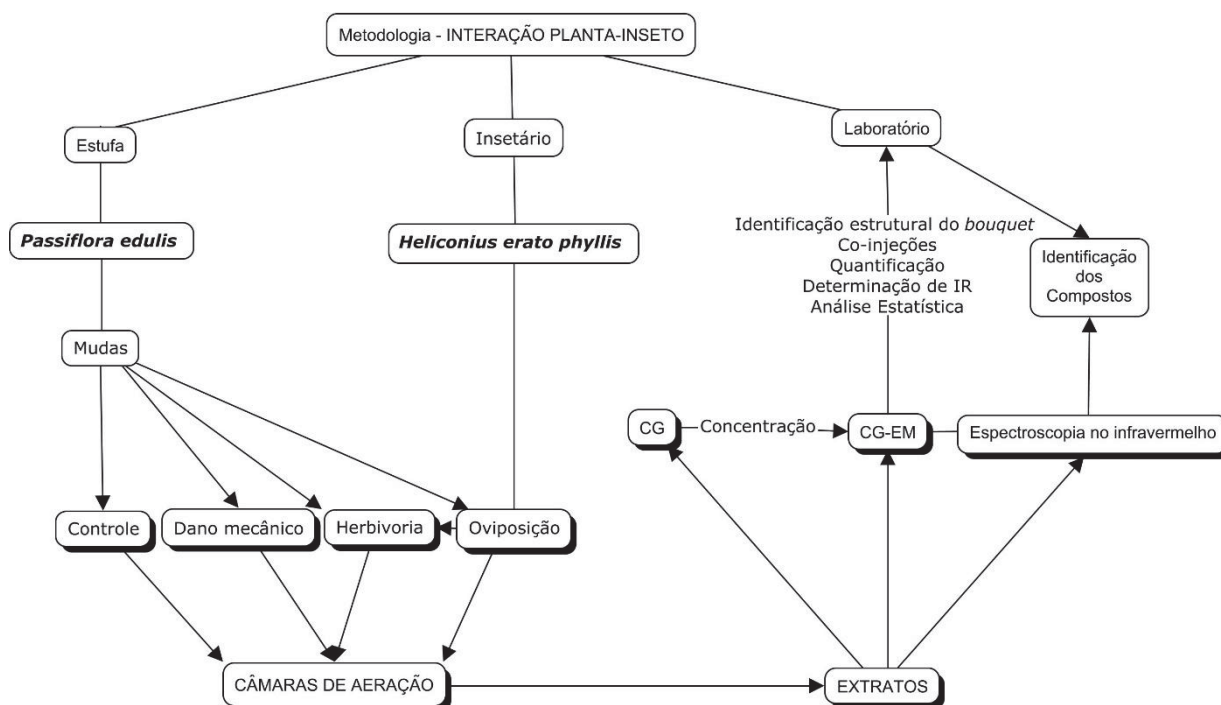
Especular sobre quais são os compostos constituintes da planta hospedeira que possivelmente originaram compostos constituintes dos feromônios estudados.

## 2 METODOLOGIA

Após o plantio de duzentas (200) mudas de *Passiflora edulis*, a construção de insetário, obtenção e adaptação de fêmeas para a postura e obtenção das larvas, iniciaram-se os tratamentos, as aerações e as análises químicas.

A metodologia aqui relatada encontra-se abaixo, no resumo esquemático (FIGURA 4).

FIGURA 4 - RESUMO ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DA INTERAÇÃO PLANTA-INSETO



FONTE: O autor (2018).

### 2.1 CRIAÇÃO DE *Heliconius erato phyllis* E CULTIVO DE MUDAS DE *Passiflora edulis*

Objetivo: Obtenção de espécimes dos lepidópteros, e mudas de *P. edulis* para os diferentes tratamentos aplicados.

Os adultos, fêmeas para oviposição e machos para acasalamento, foram coletados na mata nativa do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, Paraná, Brasil. A criação e manipulação de adultos ocorreu em um insetário, ambiente seminatural revestido com Sombrite®, que permite a passagem de 30% da luz solar direta. No interior do insetário foram colocados vasos com *P. edulis*, *Passiflora*

*actinia* Hooker, 1943, como substrato para oviposição, e *Lantana camara* Linnaeus, 1753, *Impatiens walleriana* Hook, e recipientes com dieta artificial (BORGES *et al.* 2010), fontes de alimentação de adultos. Em estufa foram mantidos vasos com ramos de *P. edulis* e *P. actinia* que forneceram folhas e ramos para alimentação das larvas. Os ovos coletados foram mantidos em placas de Petri revestidas com papel filtro umedecido com água destilada. As larvas foram mantidas em caixas plásticas retangulares (25cm x 10cm x 9cm). Pupas foram retiradas da superfície interna das tampas das caixas plásticas e presas a fios de cordão de algodão nas laterais de recipientes circulares plásticos translúcidos (15 cm de diâmetro, 10 cm de altura), até a emergência dos adultos. Ovos, larvas e pupas foram mantidos em área revestida por plástico translúcido e individualizada no interior do insetário. Cada semente de *Passiflora edulis* (Isla Pak ®) foi cultivada individualmente em sacos plásticos (1 cm x 25 cm) contendo solo não tratado, em estufa. As sementes eram geneticamente diferentes umas das outras, não clones.

## 2.2 SELEÇÃO DE MUDAS DE *P. edulis* E APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS

Objetivo: Obtenção de mudas da planta hospedeira para aplicação dos tratamentos.

Quatro mudas com cinco meses de idade e com dez folhas eram selecionadas. Suas raízes eram envoltas em papel alumínio com um pouco de terra úmida, e assim mantidas por 24h para adaptação à esta condição. Cada conjunto experimental continha quatro plantas, três delas tratadas (danos mecânicos, herbivoria e oviposição) e uma testemunha. Foram ao todo 12 conjuntos, que tiveram coleta de voláteis em *headspace*, em três tempos, 24h, 48h e 72h, perfazendo um total de 144 amostras. As coletas começam na mesma hora todos os dias até o final do experimento. Os tratamentos consistiram em danos mecânicos com um cortador de massa circular (3 folhas danificadas), ou Herbivoria (10 larvas), ou oviposição (cinco fêmeas acasaladas, que depositaram uma média de 20 ovos) por *H. erato phyllis* por 24 h ou foram usados como plantas de controle (FIGURA 5). As plantas foram utilizadas somente uma vez e as plantas tratadas foram sempre comparadas com plantas controle. As mudas de cada tratamento foram mantidas em salas separadas para evitar a comunicação planta-planta. As fêmeas acasaladas de *H. erato phyllis* foram identificadas pelo odor característico da glândula odorífera abdominal.

Os extratos foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até nova análise. Os COVs foram comparados entre os tratamentos utilizando-se cromatografia em fase gasosa (CG) e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).

FIGURA 5 - MUDAS DE *Passiflora edulis* (a) NÃO TRATADAS, E TRATADAS COM: (b) DANO MECÂNICO, (c) OVIPOSIÇÃO E (d) HERBIVORIA DE *Heliconius erato phyllis*.



FONTE: O autor (2015).

### 2.3 COLETA DOS VOLÁTEIS

Objetivo: Coletar os voláteis das plantas controle e tratadas para análises em CG/CG-EM.

As coletas de *headspace* foram realizadas em câmaras de vidro ( $11,5 \times 35$  cm), dentro de uma sala com condições controladas de temperatura e umidade ( $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12 L: 12 D,  $58 \pm 2\%$ ) (FIGURA 6). As amostras foram coletadas usando um fluxo de ar filtrado com umidade e carvão a  $0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  por câmara. COVs foram coletados em colunas de vidro contendo 20mg do polímero HayeSep Q 80-100 mesh (Altech,



Lokeren, Bélgica) e eluídos com 240  $\mu\text{L}$  de hexano bidestilado HPLC (ZARBIN *et al.*, 1999). Um padrão interno (PI) de heptadecano (C17: 150ng ou 750ng) foi adicionado ao extrato final. Em seguida, a concentração final de IS foi calculada e o extrato foi quantificado com base na área do pico PI. Para fins de precisão da quantificação, foram considerados apenas picos maiores que 30ng para as análises.

FIGURA 6 - MUDAS DE *Passiflora edulis* TRATADAS E NÃO TRATADA EM CÂMARAS DE AERAÇÃO



FONTE: O autor (2015).

## 2.4 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Objetivo: Analisar os extratos obtidos na aeração.

A concentração ideal para injeção no cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas (CG-EM) foi estabelecida inicialmente em cromatógrafo gasoso (CG). Os extratos foram analisados por CG-EM em um cromatógrafo gasoso Shimadzu QP 2010 Plus. O CG e o CG-EM, que foram equipados com uma coluna RTX-5 (30 m  $\times$  0,25 mm d.i., espessura do filme de 0,25 mm; Restek, Bellefonte, PA, EUA). Injeções de 1  $\mu\text{L}$  foram realizadas no modo *splitless*, com temperatura do injetor de 250 ° C (FIGURA 7). A temperatura do forno da coluna foi mantida a 50°C durante 1 min, aumentada para 250° a 7°C.min<sup>-1</sup> e mantida durante 10 min. O hélio foi o gás de transporte a uma velocidade linear de 36,3 cm.s<sup>-1</sup>. Os mesmos parâmetros foram utilizados para todas as análises.

FIGURA 7 - A COLETA DE 1  $\mu\text{L}$  DO EXTRATO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA DE MASSAS



FONTE: O autor (2015).

## 2.5 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

Objetivo: Identificar os compostos presentes nos extratos obtidos.

Os COVs foram identificados por índices de Kovats (IK) e comparações de espectros de massa com a literatura (por exemplo, ADAMS 2007), e por coinjeções com padrões comercialmente disponíveis. 5-hidroxi-4-octanona, DMNT, farnesano e TMTT foram identificados por tentativa. Nonanal, decanal, (*E*)- $\beta$ -cariofileno, (*E*)- $\beta$ -ocimeno e (*Z*)- $\beta$ -farneseno foram identificados por coinjeções com amostras autênticas (Sigma-Aldrich Chemical Company - Milwaukee, WI, EUA).

## 2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Objetivo: Analisar estatisticamente as quantificações dos compostos obtidos nos diferentes tratamentos da planta e na planta controle.

O buquê de COVs foi analisado por uma Análise de Componentes Principais (PCA), seguida por uma Análise de Variância (ANOVA). O modelo ANOVA testou todas as interações possíveis (voláteis, tratamento e tempo). Em seguida, todos os efeitos não significativos foram descartados e o melhor modelo de subconjunto foi mantido. Finalmente, um teste de Tukey foi realizado para testar as diferenças entre pares de médias.

Todos os testes foram realizados usando o programa R®, versão 3.3.1 e o R Studio versão 0.99.903 (R Development Core Team 2016).



### 3 RESULTADOS

#### 3.1 COVS DE *Passiflora edulis*: IDENTIFICAÇÃO, ANÁLISE E COMPARAÇÃO DE TRATAMENTOS

Nove compostos foram quantificados e identificados nos extratos de *P. edulis* não tratados e tratados (Tabela 1). Nenhuma diferença qualitativa entre os tratamentos foi detectada.

O terpenóide TMTT (**9**) apresentou o maior aumento de emissão após 24 h de tratamentos quando comparado com o controle: 6.381 (HB), 397 (DM) e 224 (OV) vezes mais. As plantas de HB mostraram um aumento maior na emissão de terpenóides (compostos **2**, **4**, **6-9**) após 24 horas de tratamento, quando comparadas com a OV, DM e plantas não tratadas (TABELA 1, FIGURA 8).

TABELA 1 – IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO (média ± EP) (ng) dos COVs EMITIDOS PELAS MUDAS DE *Passiflora edulis* POR 24h ÀS 72h DOS SEGUINTES TRATAMENTOS: DANO MECÂNICO (DM), HERBIVORIA (HB) E OVIPOSIÇÃO (OV) DE *Heliconius erato phyllis* (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE)

N°	Compostos	TR	IK	Controle			Dano Mecânico			Herbivoria			Oviposição		
				Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP
1	5HIOcta	6,732	891	2,21 ± 0,79	1,188 ± 0,91	1,0623 ± 0,64	0,878 ± 0,65	29,447 ± 18,684	5,615 ± 2,307	1,41 ± 0,563	15,36 ± 10,36	4,363 ± 1,85	1,9937 ± 0,98		
2	EbOci	10,225	1050	4,92 ± 3,07	62,89 ± 33,49	14,36 ± 4,62	19,11 ± 12,32	231,28 ± 82,64	78,43 ± 65,64	3,88 ± 1,76	40,70 ± 23,64	40,51 ± 17,74	265,89 ± 162,05		
3	9AI	11,450	1106	4,85 ± 0,79	30,97 ± 7,42	18,90 ± 5,14	4,78 ± 0,97	43,52 ± 14,94	17,01 ± 5,20	7,18 ± 1,58	24,29 ± 5,55	11,61 ± 2,42	5,58 ± 0,76		
4	DMINT	11,744	1119	3,24 ± 1,26	16,02 ± 5,99	14,24 ± 5,06	8,39 ± 2,71	165,71 ± 51,25	18,54 ± 12,31	2,39 ± 1,02	1,89 ± 1,89	0,19 ± 0,19	1,15 ± 1,15		
5	10AI	13,625	1206	1,07 ± 0,26	20,11 ± 5,76	9,25 ± 3,60	1,60 ± 0,45	29,14 ± 12,39	5,86 ± 2,62	2,05 ± 0,55	9,23 ± 2,78	2,20 ± 0,87	0,88 ± 0,30		
6	Far	16,051	1329	10,36 ± 1,41	12,75 ± 2,99	19,09 ± 8,81	5,91 ± 0,66	37,31 ± 25,84	18,94 ± 6,37	11,04 ± 2,10	15,38 ± 4,33	17,36 ± 5,34	7,99 ± 0,90		
7	EbCar	18,532	1462	6,79 ± 4,53	22,42 ± 8,62	23,43 ± 8,96	20,31 ± 7,25	79,76 ± 48,32	19,06 ± 10,77	32,71 ± 27,14	25,87 ± 17,28	15,19 ± 8,88	15,48 ± 8,93		
8	EbFar	20,667	1583	0,08 ± 0,05	31,78 ± 11,03	19,67 ± 5,38	9,47 ± 2,15	510,54 ± 180,91	47,54 ± 19,66	9,80 ± 3,62	19,72 ± 8,69	18,68 ± 9,36	18,82 ± 9,85		
9	TMTT														

2007; El Sayed 2016)

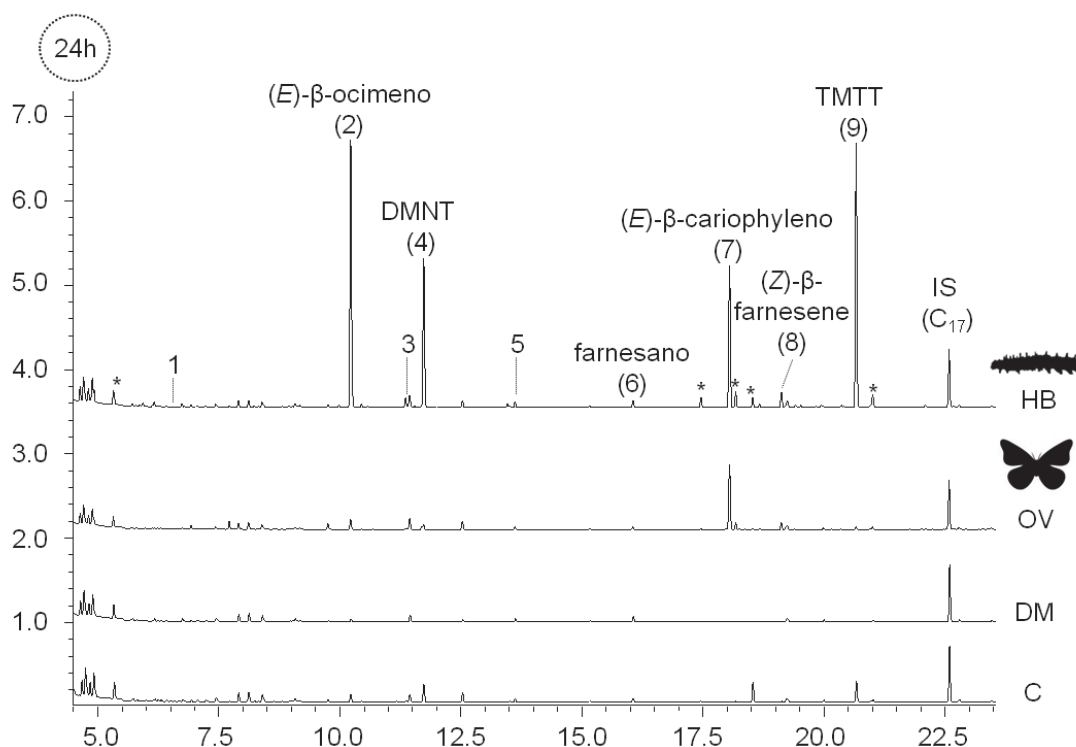
<sup>a</sup> = Identificação baseada em co-injeção com amostras autênticas

<sup>b</sup> = Compostos presentes no suco e polpa da fruta de *P. edulis* (PONTES *et al.* 2009; MARICORIS *et al.* 2011; BRAGA *et al.* 2015)

FONTE: BORGES *et al.*, 2017.

N = número do pico, IK = índice de Kovats (I<sub>KB-S-column</sub>), EP = erro padrão,  $\tau$  = identificação por tentativa baseada no espectro de massas e IK (Adams

FIGURA 8 - COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DOS EXTRATOS VEGETAIS DE *Passiflora edulis* (24h) TRATADOS COM HERBIVORIA (HB) E OVIPOSIÇÃO (OV) POR PLANTAS DE *Heliconius erato phyllis*, DANO MECÂNICO (DM) E CONTROLE (C). O CROMATOGRAMA HB REPRESENTA OS COVS (1 - 9) EMITIDOS PELAS PLANTAS DE *P. edulis*. \* CONTAMINANTES E SANGRAMENTO DE COLUNA. COVs: 1 (5-hidroxi-4-octanona), 3 (nonanal), 5 (decanal); DMNT [(E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno]; TMTT [(3E,7E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno]



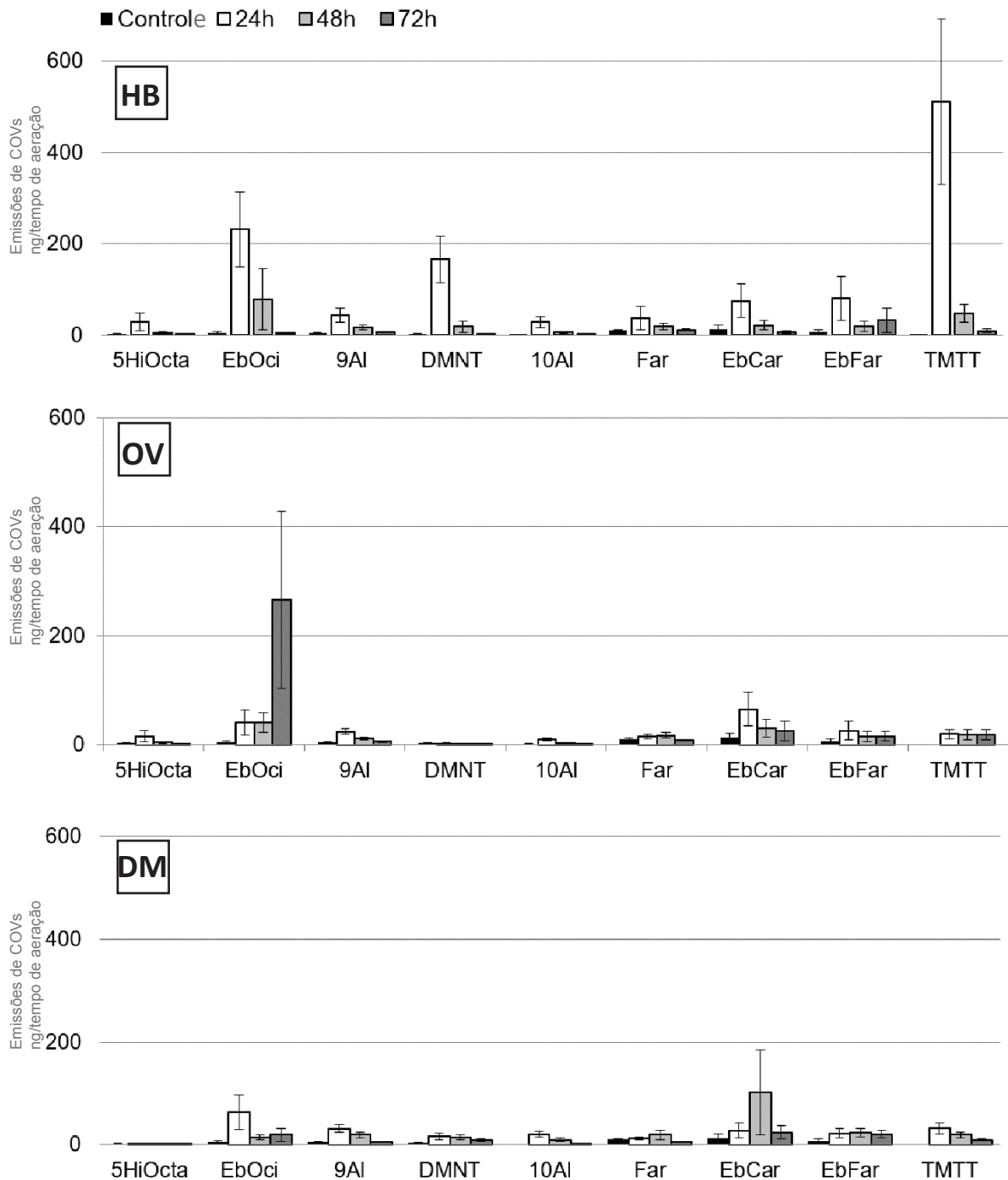
FONTE: BORGES *et al.*, 2017.

Por exemplo, *P. edulis* emitiu 50, 46, 11, 6 e 3,6 vezes mais DMNT (4), (E)-β-ocimeno, (Z)-β-farneseno, (E)-β-cariofileno e farneseno, respectivamente, após 24h de herbivoria, quando comparados com plantas controle. Após a herbivoria, os compostos 5HiOcta, EbOci, TMTT atingiram um pico de emissão às 24h (FIGURA 9).

As plantas DM mostraram um aumento geral de COVs em comparação com plantas não tratadas, geralmente atingindo um pico de emissão após 48h (Far e EbOci), com exceção de EbOci, 9Al, DMNT [(E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno], 10Al e TMTT [3E,7E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno], que apresentaram um pico de emissão em 24h (FIGURA 9).

As plantas OV emitiram (*E*)- $\beta$ -ocimeno em quantidades elevadas somente após 72h. Além disso, o nonanal e o (*E*)- $\beta$ -cariofileno atingiram um pico de emissão às 24h (FIGURA 9).

FIGURA 9 - COMPARAÇÕES ENTRE AS EMISSÕES DE COVs DE PLANTAS DE *Passiflora edulis* (ng), APÓS 24h a 72 h DE TRATAMENTOS [HERBIVORIA (HB) E OVIPOSIÇÃO (OV) POR *Heliconius erato phyllis*, DANO MECÂNICO (DM) E PLANTAS DE CONTROLE]

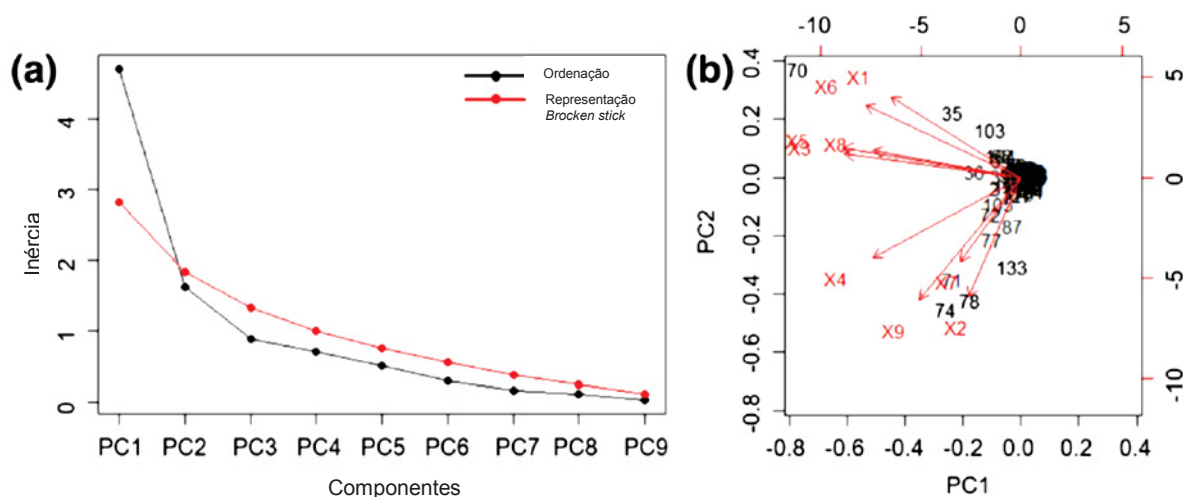


FONTE: BORGES *et al.*, 2017.

### 3.2. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises estatísticas indicaram que o primeiro componente principal (PC1) da PCA explicou 52,44% da variação (FIGURA 10a). ANOVA mostrou que os voláteis interagiram com o tratamento e tempo (Traço Pillai = 0,041,  $F_6 = 2,261$ ,  $P \leq 0,5^*$ ), com tratamento isolado (traço Pillai = 0,019,  $F_3 = 3,407$ ,  $P \leq 0,05^*$ ) e com o tempo (Pillai traço =  $4,73e-06$ ,  $F_2 = 13,557$ ,  $P < 0,001^*$ ).

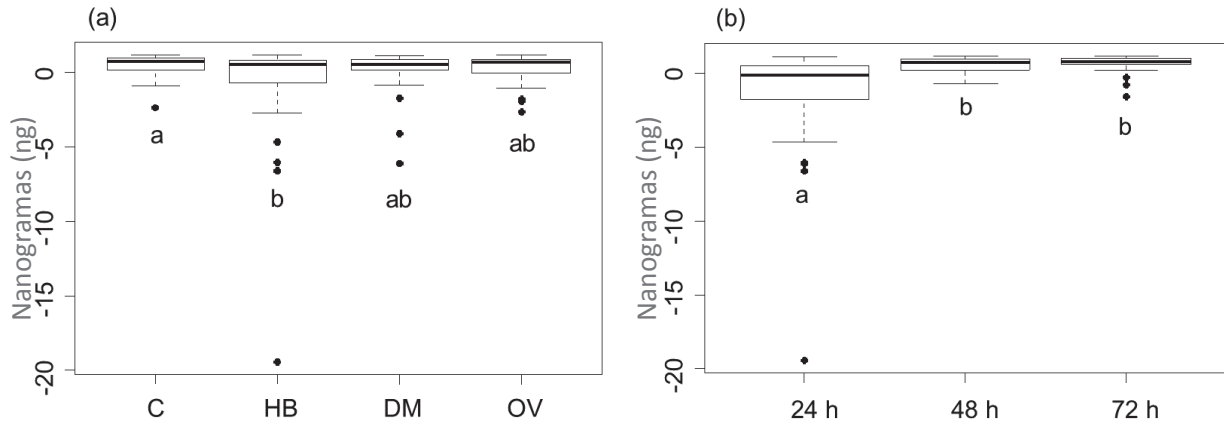
FIGURA 10 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA), QUE TESTOU O BUQUÊ DE COVS EMITIDOS POR PLANTAS DE CONTROLE E TRATADAS (DANO MECÂNICO, HERBIVORIA E OVIPOSIÇÃO POR *Heliconius erato phyllis* e *Passiflora edulis*). (a) ORDENAÇÃO DOS COMPONENTES PRINCIPAIS. PCS ACIMA DA LINHA VERMELHA SÃO SUFICIENTES PARA EXPLICAR A VARIAÇÃO NA ANÁLISE; (b) DISTRIBUIÇÃO DOS COMPOSTOS (1-9) ENTRE PC1 E PC2



FONTE: BORGES *et al.*, 2017.

Na trama dos componentes principais, é possível ver que os compostos 2, 4, 7 e 9 estão separados dos outros compostos (FIGURA 10b). Eles representam o aumento da emissão de voláteis após 24 h de herbivoria (FIGURA 11). Os testes de Tukey mostraram a distinção entre plantas HB e plantas controle (FIGURA 11a) e entre amostras tomadas em 24 h de outros tempos experimentais (FIGURA 11b).

FIGURA 11 - RESULTADOS DE PCA, TESTE ANOVA, E DE TUKEY, QUE TESTARAM O BUQUÊ DE COVS EMITIDOS POR MUDAS DE *Passiflora edulis*. a) COMPARAÇÕES DE TRATAMENTOS (CONTROLE, DANO MECÂNICO (DM), HERBIVORIA (HB) E OVIPOSIÇÃO (OV) POR *Heliconius erato phyllis*); (b) COMPARAÇÕES DE TEMPOS (24h, 48h e 72h). LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS



FONTE: BORGES *et al.*, 2017.

## 4 DISCUSSÃO

Especificamente, terpenóides [por exemplo, (*E*)- $\beta$ -ocimeno, DMNT, farnesano, (*E*)- $\beta$ -cariofileno, (*Z*)- $\beta$ -farneseno, TMTT] são frequentemente emitidos por plantas em resposta a ferimentos e ataque herbívoro (WALLING, 2000). Apesar disso, nosso estudo não mostrou diferenças qualitativas entre os tratamentos. No entanto, os resultados da ANOVA indicaram diferenças quantitativas entre os tratamentos, mostrando que as amostras coletadas às 24h após a herbivoria foram significativamente diferentes de outras amostras. Plantas tratadas emitiam claramente maior quantidade de COVs após 24h de dano, especialmente de terpenóides em plantas DM e HB. Plantas tratadas com DM mostraram aumento geral de COVs após 24 horas (EbOci, 10Al e TMTT) e 48h (Far e EbOci). A variabilidade quantitativa em emissões voláteis por plantas tratadas igualmente podem ser resultado de variação fisiológica causada por estresse biótico e abiótico (DELPHIA *et al.*, 2009; DICKE E BALDWIN, 2010), apesar de nossos esforços para manter as mudanças ambientais e experimentais estáveis (OLUWAFEMI *et al.*, 2012; KASK *et al.*, 2013; LEPPIK *et al.*, 2014; NIEDERBACHER *et al.*, 2015; KARIYAT *et al.*, 2017). Na natureza, a variação na emissão de compostos pelas plantas pode aumentar o número e a variabilidade de predadores atraídos por plantas danificadas ou não danificadas (PRICE *et al.*, 1980).

No caso das plantas de Passifloraceae, permanece desconhecido sobre os predadores e parasitoides atraídos pelos voláteis emitidos após danos causados por *Heliconius erato phyllis*. O aumento da emissão de terpenóides (EbOci, DMNT, Far, EbCar, EbFar e TMTT) é evidente, 24h após a herbivoria, Terpenóides (por exemplo,  $\alpha$ -pineno, limoneno, linalol, ocimeno, cariofileno e farneseno) geralmente são liberados após ataque de insetos, especialmente 24 horas após o dano (ARIMURA *et al.*, 2008; HEIL, 2008; WAR *et al.*, 2011; MARTINS & ZARBIN, 2013). Por exemplo em *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambará (Myrtales: Myrtaceae) as plantas liberam quantidades de monoterpenos e sesquiterpenos após o ataque por *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae) (MARTINS & ZARBIN, 2013) e plantas de soja [*Glycine max* (Linnaeus) Merrill (Fabales: Fabaceae)] emitem voláteis, incluindo canfeno, mirceno, (*E*)- $\beta$ -ocimeno, MeSA e TMTT após o ataque de insetos, que atraiu o parasitoide do ovo, *Telenomus podisi* (Ashmead, 1893) (Hymenoptera: Scelionidae) (MORAES *et al.*, 2009). O (*E*)- $\beta$ -ocimeno é um monoterpeno comumente encontrado na mistura volátil emitida pelas folhas em resposta à herbivoria e ferimentos mecânicos (PARÉ & TUMLINSON, 1999; MARTINS



*et al.*, 2016). Além disso, Fatouros *et al.* (2012) relataram a maior emissão de (*E*)- $\beta$ -ocimeno por *Brassica nigra* Linnaeus (Brassicales: Brassicaceae) ocorreu após 24 h de oviposição por *Pieris brassicae* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pieridae). Vários estudos indicam que o volátil de (*E*)- $\beta$ -ocimeno emitido pelas plantas pode servir como pista química, atraindo parasitoides, predadores e insetos polinizadores (DUDAREVA & PICHERSKY, 2000; PICHERSKY & GERSHENZON, 2002).

Em nosso estudo, o (*E*)- $\beta$ -ocimeno foi emitido após a oviposição e após dano herbívoro e mecânico, com picos de emissão às 72h e às 24h, respectivamente. Este resultado indica que (*E*)- $\beta$ -ocimeno foi liberado após um curto período (24h) em resposta a danos, e após um longo período (72h) após a oviposição, sugerindo diferentes padrões de indução e liberação pelos tecidos danificados. Além disso, a exposição de plantas a (*E*)- $\beta$ -ocimeno pode ativar a expressão de genes relacionados à defesa, como em *Arabidopsis thaliana* (Linnaeus) Heynh (Brassicales: Brassicaceae) (FAÏDT *et al.*, 2003), através do liberação de sinais geneticamente direcionados pela planta emissora e seu transporte, absorção e percepção pelo planta receptora por meio de receptores de VOCs (BALDWIN *et al.*, 2006). O aumento de (*E*)- $\beta$ -ocimeno indica que plantas como *P. edulis* podem usar este volátil como um sinal para predadores e outras plantas para indicar a presença de herbívoros.

As borboletas frequentemente usam compostos químicos obtidos de plantas para produzir seus sinais voláteis (BOPPRÉ, 1984; SCHULZ *et al.*, 2004). O (*E*)- $\beta$ -ocimeno é descrito como um composto antifrodísíaco de *Heliconius melpomene* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Nymphalidae), e está presente nas glândulas odoríferas abdominais das valvas dos machos de várias espécies de *Heliconius* Kluk, 1780 (SCHULZ *et al.*, 2008; ESTRADA *et al.*, 2011). Por esta razão, sugere-se que (*E*)- $\beta$ -ocimeno (5) pode ser sequestrado de *Passiflora edulis* por larvas de *Heliconius*, incluindo larvas de *H. erato phyllis*, para compor o buquê odorífero das glândulas odoríferas abdominais localizadas nas valvas de machos adultos (BORGES *et al.*, dados não publicados).

Os homoterpenos DMNT e TMTT (respectivamente, (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno e (3*E*,7*E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno) são emitidos por várias plantas, incluindo milho, feijão-fava, *Arabidopsis* e tomate (HOPKE *et al.*, 1994; AMENT *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2016). TMTT foi relatado como um volátil induzido de algodão, *Gossypium hirsutum* (HEGDE *et al.*, 2011) (Malvales: Malvaceae), infestado com *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Homoptera: Aphididae). Além disso, plantas de *A.*

*thaliana* (BRUCE *et al.*, 2008) e *G. max* (MORAES *et al.*, 2009) tratados com *cis*-jasmona também apresentaram emissão induzida de TMTT. Nos campos de algodão, o DMNT sintético liberado pelos dispersores controlados atraiu predadores generalistas pertencentes a diferentes ordens taxonômicas de insetos (YU *et al.*, 2008). Segundo Chen *et al.* (2011), o DMNT desempenha um papel importante na defesa de plantas. Plantas de *tomate* e *Arabidopsis*, por exemplo, emitem DMNT que é subsequentemente usado como um caimônio por ácaros predadores (KANT *et al.*, 2004; KAPPERS *et al.*, 2005).

(*E*)- $\beta$ -cariofileno foi relatado para atrair inimigos de herbívoros acima e abaixo do solo em milho (KOLLNER *et al.*, 2008) e ser emitido por plantas de milho atacadas por larvas de *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, 1868 (Coleoptera: Chrysomelidae) que atraem nematoides patogênicos que infectam e matam a raiz (DEGENHARDT *et al.*, 2009). Irmisch *et al.* (2014) descreveram este composto como um volátil induzido por herbívoros no álamo.

(*E*)- $\beta$ -farneseno tem um papel importante nas interações planta-inseto (CROCK *et al.* 1997). Os insetos liberam  $\beta$ -farneseno tanto como feromônio quanto como alomônio, e muitos dos predadores detectados emitem o  $\beta$ -farneseno como um caimônio para localizar sua presa (PARÉ & TUMLINSON, 1999). Assim, os sesquiterpenos (*Z*)- $\beta$ -farneseno, (*E*)- $\beta$ -farneseno, (*Z,E*)- $\alpha$ -farneseno, (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, e (*E*)-nerolidol foram identificados em *Pteris vittata* Linnaeus (Polypodiales: Pteridaceae) em resposta à herbivoria de larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae) (IMBISCUSO *et al.*, 2009). Plantas geneticamente modificadas que expressam constitutivamente (*E*)- $\beta$ -farneseno, que é um feromônio de alarme de muitas espécies de afídeos, não só repeliram *Myzus persicae* (SULZER, 1776) (Hemiptera: Aphididae) como também atraíram vespas parasitas, como *Diaeretiella rapae* (M'Intosh, 1855) (Hymenoptera: Braconidae) (BEALE *et al.*, 2006). Após a herbivoria, o farnesano foi emitido por plantas de *P. edulis* em pequenas quantidades em comparação com outros terpenóides. No entanto, quantidades significativamente maiores deste composto estão presentes em voláteis de crescimento bacteriano de plântulas de grãos infectados, em comparação com plantas de controle não infectadas (SUN *et al.*, 2016). Farnesano também foi relatado em mudas de *ginseng* cultivadas *in vitro* e subsequentemente mecanicamente danificadas ou tratadas com metil jasmonato (MeJA) (BALUSAMY *et al.*, 2015). Este é o primeiro estudo de voláteis emitidos por uma espécie na Passifloraceae. Apesar disso, Jardim *et*

*al.* (2010) investigaram a resposta de defesa de *P. edulis* contra espécies de dois lepidópteros: um especialista (Lepidoptera: Nymphalidae) e um generalista [*Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuide)]. Em resposta ao ataque de ambas as espécies de lepidópteros, a atividade da lipoxigenase foi induzida. Esse estudo concentrou-se em uma enzima chave da via biossintética do ácido jasmonico (13-LOX), localizado em plastídios de folhas de maracujá e é induzido em ferida e induzido por MeJa (RANGEL *et al.*, 2002). Seus resultados sugerem que a resposta de *P. edulis* à herbivoria poderia ser mediada por jasmonatos. Além disso, os efeitos de MeJa, danos mecânicos e alimentação por larvas de *A. vanillae vanillae* sobre a atividade inibitória da tripsina em folhas de maracujá também foram investigados (BOTELHO-JÚNIOR *et al.*, 2008). Todos os tratamentos causaram um acúmulo de inibidores de tripsina, que inibiram fortemente as enzimas digestivas tipo tripsina da broca-do-colmo [*Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae)], confirmando uma possível função protetora dos inibidores do dano induzido pela tripsina contra a predação de insetos.

Embora o potencial de voláteis de plantas na atração de parasitoides em programas de controle de pragas seja conhecido (ZARBIN *et al.*, 2009) e que voláteis liberados após herbivoria atraiam parasitoides (DE MORAES *et al.*, 1998), não foram encontrados predadores descritos para *H. erato phyllis*, portanto, futuros estudos devem incluir um levantamento de potenciais predadores e parasitoides de *H. erato phyllis* para avaliar o papel de COVs emitidos por plantas de Passifloraceae atacados por herbívoros.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.
- AMENT, K.; KANT, M. R.; SABELIS, M. W.; HARING, M. A.; SCHUURINK, R. C. Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. **Plant Physiology**, n. 135, v. 4, p. 2025–2037, 2004.
- ARIMURA, G. I.; MATSUI, K.; TAKABAYASHI, J. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. **Plant and Cell Physiology**, n. 50, p. 911–923, 2009. <http://doi:10.1093/pcp/pcp030>
- ARIMURA, G.; KÖPKE, S.; KUNERT, M.; VOLPE, V.; DAVID, A.; BRAND, P. *et al.* Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves: IV. Diurnal and nocturnal damage differentially initiate plant volatile emission. **Plant Physiology**, n. 146, p. 965–973, 2008. <http://doi:10.1104/pp.107.111088>
- BALDWIN, I. T.; HALITSCHKE, R.; PASCHOLD, A.; VON DAHL, C. C.; PRESTON, C. A. Volatile signaling in plant-plant interactions: “Talking Trees” in the genomics era. **Science**, v. 311, p. 812–815, 2006.
- BALUSAMY, S. R. D.; RAHIMI, S.; SUKWEENADHI, J.; KIM, Y.-J.; YANG, D.-C. Exogenous methyl jasmonate prevents necrosis caused by mechanical wounding and increases terpenoid biosynthesis in *Panax ginseng*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, p. 341–348, 2015. <http://doi:10.1007/s11240-015-0838-8>
- BEALE, M. H.; BIRKETT, M. A.; BRUCE, T. J. A.; CHAMBERLAIN, K.; FIELD, L. M.; HUTTLY, A. K.; MARTIN, J. L.; PARKER, R.; PHILLIPS, A. L.; PICKETT, J. A.; PROSSER, I. M.; SHEWRY, P. R.; SMART, L. E.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M.; ZHANG, Y. Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphids and parasitoid behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 27, v. 103, p.10509–10513, 2006.
- BENSON, W. W.; BROWN, K. S. J.; GILBERT, L. E. Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. **Evolution**, v. 29, p.659–680, 1976.
- BIANCHI, V.; MOREIRA, G. R. P. Preferência alimentar, efeito da planta hospedeira e da densidade larval na sobrevivência e desenvolvimento de *Dione juno juno* (Cramer,) (Lepidoptera: Nymphalidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, n. 22, v. 1, p. 43–50, 2005.
- BOPPRÉ, M. Chemically mediated interactions between butterflies. In: Vane-Wright RI, Ackery PR (eds) **The Biology of Butterflies**, v. 11, Academic Press, London, p. 259–275, 1984.
- BORGES, E. De O.; FACCIONE-HAUSER, M. C.; MOREIRA, G. P. R. Morphology of the prosternal glands of *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae), 2010. **Psyche**. <http://doi:10.1155/2010/892960>
- BORGES, E. DE O.; MARTINS, C. B. C.; SILVA, R. R. DA; ZARBIN, P. H. G. Terpenoids dominate the bouquet of volatile organic compounds produced by *Passiflora edulis* in response to herbivory by *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Arthropod-Plant Interactions**, v. 12, p. 123, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11829-017-9560-2>

BOTELHO-JÚNIOR, S.; SIQUEIRA-JR, C. L.; JARDIM, B. C.; MACHADO, O. L.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; PERALES, J.; JACINTO, T. Trypsin inhibitors in passion fruit (*Passiflora f. edulis flavicarpa*) leaves: accumulation in response to methyl jasmonate, mechanical wounding, and herbivory. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 9404–9409, 2008.

BRAGA, G. C.; PRADO, A.; DA PINTO, J. S.; DE ALENCAR, S. M. Volatile profile of yellow passion fruit juice by static headspace and solid phase micro extraction techniques. **Ciência Rural**, n. 2, v. 45, p. 356–363, 2015.

BROWN, K. S. JR.; MIELKE, O. H. H. The Heliconians of Brazil (Lepidoptera: Nymphalidae). Part II. Introduction and General Comments, with a supplementary Revision of the Tribe. **Zoologica (NY)**, v. 57, p. 1–40, 1972.

BRUCE, T. J. A.; PICKETT, J. A. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects – Finding the right mix. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1605-1611, 2011.

BRUCE, T. J.; MATTHES, M.; CHAMBERLAIN, K.; WOODCOCK, C. M.; MOHIB, A.; WEBSTER, B.; SMART, L. E.; BIRKETT, M. A.; PICKETT, J. A.; NAPIER, J. A. Cis-Jasmone induces *Arabidopsis* genes that affect the chemical ecology of multitrophic interactions with aphids and their parasitoids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 12, v. 105, p. 4553–4558, 2008.

CHEN, F.; THOLL, D.; BOHLMANN, J.; PICHERSKY, E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. **Plant Journal**, n. 66, v. 1, p. 212–229, 2011.

CROCK, J.; WILDUN, G. M.; CROTEAU, R. Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha x piperita*, L) that produces the aphid alarm pheromone (*E*)- $\beta$ farnesene. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 94, p. 12833–12838, 1997.

DE MORAES, C. M.; LEWIS, W. J.; PARE, P. W. Herbivore infested plants selectively attract parasitoids. **Nature**, v. 393, p. 570–573, 1998.

DE MORAES, C. M.; MESCHER, M. C.; TUMLINSON, J. H. Caterpillar induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. **Nature**, v. 410, p. 577–580, 2001.

DEGENHARDT, J.; HILTPOLD, I.; KÖLLNER, T. G.; FREY, M.; GIERL, A.; GERSHENZON, J.; HIBBARD, B. E.; ELLERSIECK, M. R.; TURLINGS, T. C. J. Restoring a maize root signal that attracts insect-killing nematodes to control a major pest. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, n. 106, v. 32, p. 13213–13218, 2009.

DELPHIA, C. M.; ROHR, J. R.; STEPHENSON, A. G.; DE MORAES, C. M., MESCHER, M. C. Effects of genetic variation and inbreeding on volatile production in a field population of horsenettle. **International Journal of Plant Sciences**, n. 170, v. 1, p. 12–20, 2009.

DICKE, M.; BALDWIN, I. T. The evolutionary context for herbivore induced plant volatiles: beyond the ‘cry for help’. **Trends in Plant Sciences**, n. 15, v. 3, p. 167–175, 2010.

DICKE, M.; LORETO F. Induced plant volatiles: from genes to climate change. **Trends in Plant Science**, v.15, n.3, p. 115-117, 2010.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. **Plant Physiology**, v. 122, p. 627–633, 2000.



EHRlich, P. R.; RAVEN, P. H. Butterflies and Plants: a study in coevolution. **Evolution**, n. 4, v. 18, p. 586–608, 1964.

EL-SAYED, A. M. **The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals**, 2003-2018. Disponível em <http://www.pherobase.com> Acesso em 12/09/2017.

ESTRADA, C.; SCHULZ, S.; YILDIZHAN, S.; GILBERT, L. E. Sexual selection drives the evolution of anti-aphrodisiac pheromones. **Evolution**, n. 65, v. 10, p. 2843–2854, 2011.

FATOUROS, N. E.; LUCAS-BARBOSA, D.; WELDEGERGIS, B. T.; PASHALIDOU, F. G.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M.; HARVEY, J. A.; GOLS, R.; HUIGENS, M. E. Plant volatiles induced by herbivore egg deposition affect insects of different trophic levels. **Public Library of Science one**, n. 7, v. 8, p. e43607, 2012.

GILBERT, L. E. Biodiversity of a Central American *Heliconius* community: pattern, process and problems. In: Price PW, Fernandes GW, Benson WW (eds) **Plant-animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions**. Wiley, New York, p. 403–427, 1991.

GILBERT, L. E. Butterfly-plant evolution: has *Passiflora adenopoda* won the selectional race with heliconiine butterflies? **Science**, n. 172, p. 585–586, 1971.

GILBERT, L. E. Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plants. In: Gilbert LE, Raven PH (eds) **Coevolution of animals and plants**. The University of Texas, Austin, 1975.

GILBERT, L. E. The coevolution of a butterfly and a vine. *Sci Am* 247:102–107, 1982.

HATANO, E.; SAVEER, A. M.; BORRERO-ECHEVERRY, F.; STRAUCH, M.; ZAKIR, A.; BENGTTSSON, M.; IGNEll, R.; ANDERSON, P.; BECHER, P. G.; WITZGALL, P.; DEKKER, T. An herbivore-induced plant volatile interferes with host plant and mate location in moths through suppression of olfactory signalling pathways. **BMC Biology**, n. 13, p. 75, 2015.

HEGDE, M.; OLIVEIRA, J. N.; DA COSTA, J. G.; BLEICHER, E.; SANTANA, A. E. G.; BRUCE, T. J. A.; CAULFIELD, J.; DEWHIRST, S. Y.; WOODCOCK, C. M.; PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A. Identification of semiochemicals released by cotton, *Gossypium hirsutum*, upon infestation by the cotton aphid, *Aphis gossypii*. **Journal of Chemical Ecology**, n. 37, v. 7, p. 741–750, 2011.

HEIL, M. Indirect defence via tritrophic interactions. **New Phytologist**, v. 178, p. 41–61, 2008.

HILKER, M.; MEINERS, T. Early herbivore alert: insect eggs induce plant defense. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, p. 1379–1397, 2006.

HOPKE, J.; DONATH, J.; BLECHERT, S.; BOLAND, W. Herbivore-induced volatiles – the emission of acyclic homoterpenes from leaves of phaseolus-lunatus and zea-mays can be triggered by a beta glucosidase and jasmonic acid. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, n. 352, v. 2, p. 146–150, 1994.

HORAS, V. R.; SILVA, M. A. N.; ANNIES, V.; MAIA, B. H. L. N. S.; MARQUES, F. A.; SILVA, M. F. G. F. Noctuidae- induced plant volatiles: current situation and prospects. **Química Nova**, n. 37, v. 10, p. 1663–1669, 2014.

IMBISCUSO, G.; TROTTA, A.; MAFFEI, M.; BOSSI, S. Herbivory induces a ROS burst and the release of volatile organic compounds in the fern *Pteris vittata* L. **Journal of Plant Interactions**, n. 1, v. 4, p. 15–22, 2009.

IRMISCH, S.; JIANG, Y.; CHEN, F.; GERSHENZON, J.; KÖLLNER, T. G. Terpene synthases and their contribution to herbivore-induced volatile emission in western balsam poplar (*Populus trichocarpa*). **BMC Plant Biology**, v. 14, p. 270, 2014.

JARDIM, B. C.; BERBERT-MOLINA, M. A.; RODRIGUES, D. C.; BOTELHO-JÚNIOR, S.; VICENTE, A. C.; HANSEN, E.; OTSUKI, K.; URMËNYI, T. P.; JACINTO, T. Herbivore response in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) plants: induction of lipoxygenase activity in leaf tissue in response to generalist and specialist insect attack. **Protein & Peptide Letters**, n. 17, v. 4, p. 480–484, 2010.

KANT, M. R.; AMENT, K.; SABELIS, M. W.; HARING, M. A.; SCHUURINK, R. C. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. **Plant Physiology**, n. 135, v. 1, p. 483–495, 2004.

KAPPERS, I. F.; AHARONI, A.; VAN HERPEN, T. W. J. M.; LUCKERHOFF, L. L. P.; DICKE, M.; BOUWMEESTER, H. J. Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. **Science**, n. 309, v. 5743, p. 2070–2072, 2005.

KARIYAT, R. R.; MAUCK, K. E.; BALOGH, C. M.; STEPHENSON, A. G.; MESCHER, M. C.; DE MORAES, C. M. Inbreeding in horsenettle (*Solanum carolinense*) alters night-time volatile emissions that guide oviposition by *Manduca sexta* moths. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 280, p. 20130020, 2017.

KASK, K.; KÄNNASTE, A.; NIINEMETS, Ü. Emission of volatile organic compounds as a signal of plant stress. **Scientific Bulletin of ESCORENA**, v. 8, p. 79–93, 2013.

KOLLNER, T. G.; HELD, M.; LENK, C.; HILTPOLD, I.; TURLINGS, T. C. J.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. A maize (*E*)-beta-caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most american maize varieties. **Plant Cell**, n. 20, v. 2, p. 482–494, 2008.

LEPPIK, E.; TAMMARU, T.; FRÉROT, B. A view of diel variation of maize odorscape. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p.811–820, 2014.

MACORIS, J. N. S.; GARRUTI, D. D. S.; MONTEIRO, M. Volatile; compounds from organic and conventional passion fruit (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) pulp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 31, v. 2, p. 430–435, 2011.

MACORIS, M. S.; JANZANTTI, N. S.; GARRUTI D. dos S.; MONTEIRO, M. Volatile compounds from organic and conventional passion fruit (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) pulp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 31, v. 2, p. 430–435, 2011.

MARTINS, C. B. C.; VIDAL, D. M.; GOMES, S. M. S.; ZARBIN, P. H. G. Volatile organic compounds (VOCs) emitted by *Ilex paraguariensis* plants are affected by the herbivory of the lepidopteran *Thelosia camina* and the coleopteran *Hedypathes betulinus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2016. <http://doi:10.21577/0103-5053.20160279>

MARTINS, C. B. C.; ZARBIN, P. H. G. Volatile organic compounds of conspecific-damaged *Eucalyptus benthamii* influence responses of mated females of *Thaumastocoris peregrinus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p. 602–611, 2013. <http://doi:10.1007/s10886-013-0287-y>

MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; PAREJA, M.; SERENO, F. T. P. S.; MICHEREFF, M. F. F.; BIRKETT, M. A.; PICKETT, J. A.; BORGES, M. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with cis-jasmone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 131, p. 178–188, 2009.

NIEDERBACHER, B.; WINKLER, J. B.; SCHNITZLER, J. P. Volatile organic compounds as non-invasive markers for plant phenotyping. **Journal of the Society of Experimental Botany**, n. 18, v. 66, p. 5403–5416, 2015.

OLUWAFEMI, S.; BIRKETT, M. A.; CAUFIELD, J.; PICKETT, J. A. Variability of volatile organic compounds emitted by seedlings of seven African maize varieties when infested by adult *Cicadulina storeyi* china leafhopper vectors of maize streak virus. **The African Crop Science Journal**, n. 2, v. 20, p. 117–124, 2012.

PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. H. plant volatiles as a defense against insect herbivores. **Plant Physiology**, v. 121, p. 325–331, 1999.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 237–243, 2002.

PIERIK, R.; BALLARÉ, C. L.; DICKE, M. Ecology of plant volatiles: taking a plant community perspective. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, p. 1845–1853, 2014.

PINTO-ZEVALLOS, D. M.; MARTINS, C. B. C.; PELLEGRINO, A. C.; ZARBIN, P. H. G. Volatile organic compounds in induced plant defense against herbivorous insects. **Quim Nova**, v. 9, n. 36, p. 1395–1405, 2013.

PONTES, M.; MARQUES, J. C.; CÂMARA, J. S. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometric methodology for the establishment of the volatile composition of *Passiflora* fruit species. **Microchemical Journal**, v. 93, p. 1–11, 2009.

PRICE, P. W.; BOUTON, C. E.; GROSS, P.; MCPHERON, B. A.; THOMPSON, J. N.; WEIS, A. E. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. **The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 11, p. 41–65, 1980.

R DEVELOPMENT CORE TEAM R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, 2016. <http://www.R-project.org/Rangel>

RANGEL, M.; MACHADO, O. L. T.; DA CUNHA, M.; JACINTO, T. Accumulation of chloroplast-targeted lipoxygenase in passion fruit leaves in response to methyl jasmonate. **Phytochemistry**, v. 60, p. 619–625, 2002.

RASMANN, S.; KÖLLNER, T. G.; DEGENHARDT, J.; HILTPOLD, I.; TOEPFER, S.; KUHLMANN, U.; GERSHENZON, J.; TURLINGS, T. C. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. **Nature**, v. 434, n. 7034, p. 732–7, 2005.

ROSSETTO, C. J.; CAVALCANTE, R. D.; GRISI, J. R. C.; CARVALHO, A. M. Insetos do maracujazeiro, *Passiflora* spp. In: **Simpósio sobre a cultura do maracujá**. SBF/CATI, Campinas, 1974.

SCHOONHOVEN, L.; VAN LOON, J.; DICKE, M. **Insect-Plant Biology**. Oxford, University Press, p. 421, 2005.

SCHULZ, S.; BECCALONI, G.; BROWN, K. S.; BOPPRÉ, M.; FREITAS, A. V. L.; OCKENFELS, P.; TRIGO, J. R. Semiochemicals derived from pyrrolizidine alkaloids in male ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 699–713, 2004.



SCHULZ, S.; ESTRADA, C.; YILDIZHAN, S.; BOPPRÉ, M.; GILBERT, L. E. An antiaphrodisiac in *Heliconius melpomene* butterflies. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 82–93, 2008.

SMILEY, J. T. Are chemical barriers necessary for evolution of butterfly-plant associations? **Oecologia**, v. 65, p. 580–583, 1985a.

SMILEY, J. T. *Heliconius* caterpillar mortality during establishment on plants with and without attending ants. **Ecology**, v. 66, p. 845–849, 1985b.

SPENCER, K. C. Chemical mediation of coevolution in the *Passiflora-Heliconius* interaction, 167–240. In: Spencer KC (ed) **Chemical mediation of evolution**. Academic Press Inc, San Diego, p 609p, 1988.

SUN, Z.; LIU, Z.; ZHOU, W.; JIN, H.; LIU, H.; ZHOU, A.; ZHANG, A.; WANG, M-Q. Temporal interactions of plant - insect - predator after infection of bacterial pathogen on rice plants. **Scientific Reports**, v. 6, p. 26043, 2016. <http://doi:10.1038/srep26043>

WALLING, L. L. The myriad plant responses to herbivores. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 19, p. 195–216, 2000.

WAR, A. R.; SHARMA, H. C.; PAULRAJ, M. G.; WAR, M. Y.; IGNACIMUTHU, S. Herbivore induced plant volatiles Their role in plant defense for pest management. **Plant Signaling & Behavior**, n. 6, v. 12, p. 1973–1978, 2011.

WILLIAMS, K. S.; GILBERT, L. E. Insects as selective agents on plant vegetative morphology: egg mimicry reduces egg laying by butterflies. **Science**, v. 212, p. 467, 1981.

WU, J. Q.; BALDWIN, I. T. Herbivory-induced signalling in plants: perception and action. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, p. 1161–1174, 2009.

YU, H.; ZHANG, Y.; WU, K.; GAO, X. W.; GUO, Y. Y. Field-testing of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects. **Environmental Entomology**, n. 37, v. 6, p. 1410–1415, 2008.

ZAKIR, A.; SADEK, M. M.; BENGTSSON, M.; HANSSON, B. S.; WITZGALL, P.; ANDERSON, P. Herbivore-induced plant volatiles provide associational resistance against an ovipositing herbivore. **Journal of Ecology**, v. 101, p. 410–417, 2013. <http://doi:10.1111/1365-2745.12041>

ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA, J. T. B.; LEAL, W. S. General methodologies employed on the isolation and structural identification of insects pheromones. **Química Nova**, v. 22, p. 263–268, 1999.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Insect pheromones: technology and challenges for a competitive agriculture in Brazil. **Química Nova**, v. 32, p. 722–731, 2009.

Capítulo II. AS INTERAÇÕES QUÍMICAS INSETO-INSETO – FEROMÔNIOS  
AFRODISÍACOS (ANDROCÔNIA ALAR E ACASALAMENTO PUPAL)

## RESUMO

CAPÍTULO II. Os voláteis emitidos pela androcônia alar e pelas pupas dos lepidópteros, são considerados feromônios afrodisíacos por atuarem sobre companheiros sexuais, estimulando a cópula, no primeiro caso permitindo a escolha do parceiro pela fêmea e no segundo, a cópula ocorre de maneira coercitiva pelo macho. A androcônia alar está presente nas asas dos machos e é formada conjunto de escamas diferenciadas responsáveis pela dispersão de voláteis durante a corte, que irão tornar a fêmea predisposta ao acasalamento. As pupas de fêmeas e de machos podem emitir voláteis que permitem ao macho reconhecer a pupa fêmea e conseqüentemente realizar a guarda pupal e o acasalamento pupal. Diante disso, o presente estudo apresenta os compostos químicos voláteis presentes nos bouquets odoríferos relacionados à androcônia alar de *Heliconius erato phyllis*, *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei* e, relacionados à guarda e ao acasalamento pupal. As implicações decorrentes da composição estrutural, similaridades e diferenças existentes nos bouquets, são analisadas à luz da ecologia química. A abordagem metodológica partiu de uma revisão bibliográfica sobre os temas abordados e consistiu em análises morfológicas de MO, MEV e MET e em análises químicas de cromatografia em fase gasosa, cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas e microextração em fase sólida, dos voláteis emitidos. Como resultado das análises morfológicas verificou-se que em *H. erato phyllis* a escama androconial possui maior largura e menor comprimento que o androconium de *H. ethilla narcaea* e *H. besckei* e que vesículas no interior da escama são provavelmente responsáveis pela manutenção da forma da escama, armazenamento e liberação dos voláteis de feromônio; que se supõem ocorrer por fricção entre as duas faces do escama. *H. erato phyllis* e *H. ethilla narcaea* possivelmente são mais eficientes em eliminar os voláteis por apresentarem maior quantidade de espaços vazios entre as vesículas. Como resultado das análises químicas, verificou-se que a faixa de sobreposição das asas anteriores e posteriores dos machos de *Heliconius erato phyllis* possuem os compostos: Hexadecanol, ácido hexadecanóico, estereato de etila, tricosano, (11Z)-icos-11-enol, 11-metil-tricosano, 13-(Z)-docosenal, pentacontano, e tetracosanal, em maior quantidade na asa posterior no macho excitado e não excitado; e que a quantidade geral de compostos são equivalentes no macho excitado e não excitado. Em machos de *Heliconius ethilla narcaea* a faixa de sobreposição das asas anteriores e posteriores possuem os compostos: (9Z)-heneicos-9-eno, heneicosano, tricosano, (9Z)-tricos-9-eno, (11Z)-icos-11-enol, (13Z)-docos-13-enol, pentacontano, heptacosano, e esqualeno, em maior quantidade na asa posterior no macho excitado e não excitado; e que o macho não excitado tem maior quantidade geral de compostos. Machos de *Heliconius besckei* apresentam na faixa de sobreposição das asas anteriores e posteriores os compostos: Heneicosano, tricosano, pentacontano, heptacosano, e esqualeno, em maior quantidade na asa posterior no macho excitado e não excitado; e que o macho não excitado tem maior quantidade geral de compostos. Assim sendo comparando-se os resultados das quantificações dos compostos e a morfologia do androconium em cada lepidóptero conclui-se que a escama androconial de *H. erato phyllis* elimina mais eficientemente os compostos encontrados nos bouquets odoríferos da androcônia, seguida de *H. ethilla narcaea* e *H. besckei*. Os voláteis de pupas de machos e fêmeas foram inicialmente estudados e os resultados não foram concluídos devido à pequena quantidade de amostras analisadas adequadamente.

Palavras-chave: Androcônia. Ecologia química. Borboletas. Pupas. Vantagens morfológicas.

## ABSTRACT

CHAPTER II. The volatiles emitted by the alar androconia and the pupae of the Lepidoptera are considered aphrodisiac pheromones that act on sexual partners, stimulating the copula, in the first case allowing the choice of partner by the female and, in the second, copulation occurs in a coercive manner by the male. The alar androconia is present in the wings of the males and is a formed set of differentiated scales responsible for the dispersion of volatile during the cut, which will make the female predisposed to mating. The pupae of females and males can emit volatiles that allow the male to recognize the female pupa and consequently perform the pupal guard and the pupal mating. Therefore, the present study investigates the volatile chemical compounds found in the odoriferous bouquets related to the alar androconia of *Heliconius erato phyllis*, *Heliconius ethilla narcaea* and *Heliconius besckei*, and related to the guard and to the pupal mating. The implications of structural composition, similarities and differences in bouquets are analyzed in the light of chemical ecology. The methodological approach was based on a bibliographical review of the topics in question and consisted of morphological analyses of MO, MEV and MET and chemical analyzes of gas chromatography, gas chromatography coupled with mass spectrometry and solid phase microextraction of emitted volatiles. As a result of the morphological analyses, it was confirmed that in *H. erato phyllis* the androconial scale is wider and shorter than the androconium of *H. ethilla narcaea* and *H. besckei*, and that vesicles inside the scale are probably responsible for the maintenance of the shape of the scale, storage and release of pheromone volatiles, which are supposed to occur by friction between the two faces of the scale. *H. erato phyllis* and *H. ethilla narcaea* are possibly more efficient at eliminating volatiles because they present more voids between the vesicles. Chemical analyses showed that the overlapping range of the anterior and posterior wings of *H. erato phyllis* males has the following compounds: Hexadecanol, hexadecanoic acid, ethyl ester, trichosan, (11Z)-icos-11-enol, 11-methyltricosan, 13-(Z)-docosenal, pentacontane, and tetracosanal, in greater quantities in the posterior wing in the excited and non-excited male; and that the general amount of compounds are equivalent in the excited and non-excited male. In *H. ethilla narcaea* males, the overlapping range of the anterior and posterior wings has the following compounds: (9Z)-heneicos-9-ane, heneicosane, tricosane, (9Z)-tricos-9-ene, (11Z)-icos-11-enol, (13Z)-docos-13-enol, pentacontane, heptacosane, and squalene, in greater quantities in the posterior wing in the excited and non-excited male, and that the non-excited male has the highest overall amount of compounds. *Heliconius besckei* males present the following compounds in the overlap range of the anterior and posterior wings: Heneicosane, tricosane, pentacontane, heptacosane, and squalene, in greater quantities in the posterior wing in the excited and unmotivated male, and the non-excited male has the highest overall amount of compounds. Thus, by comparing the results of the quantification of the compounds and the morphology of androconium in each lepidopteran, it is concluded that the androconial scale of *H. erato phyllis* eliminates the compounds found in the odoriferous bouquets of androconia more efficiently, followed by *H. ethilla narcaea* and *H. besckei*. The volatiles of male and female pupae were initially studied, and the results were not concluded due to the small amount of samples analyzed properly.

Keywords: Androconia. Chemical ecology. Butterflies. Pupae. Morphological advantages.

## 1 INTRODUÇÃO

Os feromônios sexuais afrodisíacos em lepidópteros são classificados, de acordo com a área de abrangência da pluma odorífera, em sinais químicos de longo e de curto alcance. Os voláteis afrodisíacos de longo alcance estão envolvidos na atração de companheiros em longas distâncias, enquanto que aqueles de curto alcance desempenham um papel no comportamento de corte (HARTLIEB & ANDERSON, 1999), e ambos são formados por misturas de compostos químicos (WYATT, 2003). Nas mariposas as fêmeas produzem feromônios que são quase que exclusivamente de longo alcance; sendo, a maioria deles, sintetizados em glândulas abdominais (Base de dados de feromônios e semioquímicos, EL-SAYED de 2018). Por exemplo, a fêmea de *Bombix mori* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera, Bombycidae), secreta o atrativo sexual bombicol (BUTENANDT *et al.*, 1959; BUTENANDT & HECKER, 1961), primeiro feromônio descrito na literatura, pelos sáculos abdominais laterais (STEINBRECHT, 1964).

Em Rhopalocera (borboletas), os voláteis afrodisíacos do macho são usualmente empregados como sinais de curto alcance durante a corte (MYERS, 1972; BIRCH *et al.*, 1990; VANE-WRIGHT & BOPPRÉ, 1993). Os odores são produzidos nas glândulas odoríferas e são normalmente emitidos quer a partir das escamas transformadas das androcônia, ou a partir de “*hair-pencils*”, como em muitas espécies da subfamília Danainae (Nymphalidae) ou em mariposas da família Arctiidae, geralmente encontrado na ponta eversível do abdômen, denominada de coremata (BROWER *et al.*, 1965; MEINWALD *et al.*, 1969; PLISKE & EISNER, 1969; PLISKE, 1974; PLISKE *et al.*, 1976). As androcônias, os coremata e os “*hair-pencils*” são os órgãos de liberação de odores associados aos feromônios afrodisíacos. Estes órgãos são encontrados nas pernas, asas, tórax ou abdômen (BIRCH *et al.* 1990). Os machos de *B. mori*, por exemplo, possuem pequenos “*hair-pencils*” inclináveis escondidos sob as pernas anteriores, possíveis liberadores de feromônio afrodisíaco (ANDERSON *et al.*, 2009).

Os coremata são glândulas eversíveis, contidas dentro de uma bainha membranosa que podem ser evertidas através de um aumento da pressão da hemolinfa, e em cuja extremidade estão presentes os sistemas complexos de androcônia, que consistem nas escovas abdominais ou “*hair-pencils*”. Estes são áreas glandulares com tufos de escamas modificadas, de formato geralmente alongado, que fazem contato com as asas imediatamente antes da dispersão do feromônio (BOPPRÉ

1986). As escovas abdominais e os coremata, em Danainae, emitem sinais de corte de curto alcance que são expandidos após potenciais parceiros reuniram-se, enquanto que em algumas mariposas Arctiidae, estas estruturas emitem feromônios que funcionam como sinais de longo alcance (WILLIS & BIRCH, 1968; WUNDERER *et al.*, 1986).

### 1.1 ANDROCÔNIA

As escamas de Lepidoptera são como um balão achatado. São formadas por quitina fina e cheias de ar (KRISTENSEN & SIMONSEN, 2003) e apresentam uma morfologia complexa envolvida com defesa, voo, termorregulação, alimentação e comunicação (GHIRADELLA, 1998, 2010). A androcônia é um grupo de escamas especializadas do macho (singular androconium) utilizadas para a dispersão de feromônios (ANDERSSON *et al.*, 2007; KLEIN & ARAÚJO, 2010; MOORE, 2014), ou seja, na comunicação sexual, e pode também produzir ou armazenar feromônios do macho (SELLIER, 1971; WASSERTHAL & WASSERTHAL, 1977; BOPPRÉ & VANE-WRIGHT, 1989). São frequentemente encontradas em “bolsas” no corpo, pernas ou asas dos machos. São comumente usadas como caráter taxonômico para distinguir espécies, como no gênero *Pseudochazara* de Lesse, 1951 (Lepidoptera: Nymphalidae: Satyrinae) (BROWN, 1976; GROSS, 1978; AUSSEM, 1980; TUZOV, 1997), e para estabelecer relações evolutivas entre as espécies (WAKEHAM-DAWSON, 1997). Tornaram-se altamente diferenciadas em muitas famílias de Lepidoptera, apresentando margens onduladas, pelos ou formas alongadas (MOORE, 2014). No gênero *Pseudochazara*, existem exceções para tamanho e forma geral do androconium (WAKEHAM-DAWSON, 1997). Análises químicas mostram que estas escamas distribuem ou também podem produzir feromônios do macho (muitos dos quais também perceptíveis para os seres humanos), embora o conhecimento da fisiologia e desenvolvimento das escamas seja escasso (ANDERSSON *et al.*, 2007).

A unidade de produção do odor (célula glandular, encaixe cuticular e escama androconial) (WASSERTHAL & WASSERTHAL, 1977), em muitas espécies das famílias Pieridae e Nymphalidae, pode ser encontrada em maior número nas chamadas manchas ou marcas sexuais sobre o dorso ou parte ventral das asas do macho (TINBERGEN *et al.*, 1942; RUTOWSKI, 1980; SCOBLE, 1992; RAUSER & RUTOWSKI, 2003). Uma exceção para a família Pieridae está no macho de *Anthocharis scolymus* Butler, 1866 (Pierinae: Anthocharidini). Este possui um odor específico que consiste no (*S*)-(+)-linalol e (*E*)- $\beta$ -farneseno (descoberto pela primeira



vez em Pieridae), que ao contrário de outras espécies da subfamília Pierinae, não possui escamas de odor nas asas. Neste são encontradas estruturas saculares nas escamas comuns da asa, muito semelhantes aos órgãos das asas do macho da subfamília Coliadinae (OKUMURA *et al.*, 2016). Em *H. melpomene* de acordo com Darrag *et al.* (2017) as escamas androconiais apresentam uma protuberância na base e estão presentes nas asas posteriores dos machos, na faixa de sobreposição e ausentes nas asas das fêmeas. As escamas androconiais são frequentemente encontradas entre outras escamas, em "tendas" ou dobras na asa. Esta localização evitaria a perda de feromônios quando os machos não estivessem envolvidos ativamente na corte (KRISTENSEN & SIMONSEN, 2003). A forma do androconium é variável apresentando extremidades filamentosas ou fimbriadas, presumivelmente para aumentar a dispersão dos voláteis que parece ocorrer por evaporação (SELLIER, 1971b; DOWNEY & ALLYN, 1975). As escamas androconiais podem ter em suas superfícies as "partículas de transferência de feromônios" (SELLIER, 1972; PLISKE & SALPETER, 1971; BOPPRE & VANE-WRIGHT, 1989) geralmente produzidas em glândulas odoríferas e responsáveis pelos odores (TINBERGEN *et al.*, 1942; RUTOWSKI, 1980; SCOBLE, 1992; RAUSER & RUTOWSKI, 2003). As glândulas foram descritas morfológicamente por Barth (1959) e Wasserthal e Wasserthal (1977), e são semelhantes as células secretoras epidérmicas de outros insetos (NOIROT & KENNEDY, 1974).

### **A diversificação das androcônias em Nymphalidae**

As espécies da família Nymphalidae apresentam uma rica variedade de estruturas sexuais secundárias. A androcônia geralmente forma manchas, franjas, tufo ou bolsos, e podem ser achatadas ou alongadas, mas muitas vezes são como "hair-pencils" eréteis como em Satyrinae e Danainae, por exemplo, que apresentam também as androcônias alares, frequentemente associadas com veias das asas. Os odores de feromônio são emitidos a partir glândulas da androcônia durante a vibração das asas do macho no decurso da corte (GRANT & BRADY, 1975; BAKER & CARDÉ, 1979; RUTOWSKI, 1980; PIVNICK *et al.*, 1992; SCHULZ *et al.*, 1993). No gênero *Bicyclus* Kirby, 1871 (Lepidoptera, Nymphalidae, Satyrinae) os machos das oitenta espécies conhecidas se diferenciam principalmente pela localização e número de glândulas de odor e escamas modificadas semelhantes a fios de cabelo que cobrem estas glândulas (CONDAMIN, 1973; LARSEN, 2005), presumindo-se que para ajudar a dispersar odores do macho (CONSTANZO & MONTEIRO, 2007). A diversificação das

androcônias e odores associados podem ter sido importantes durante a especiação e divergência dentro deste gênero. *Bicyclus anynana* (Butler, 1879) (Nymphalidae, Satyrinae) foi uma espécie utilizada na investigação sobre o funcionamento de mecanismo de seleção sexual para pistas visuais. Verificou-se que as fêmeas preferem acasalar com machos de tamanho intermediário para as pupilas presentes no centro das manchas ocelares (ROBERTSON & MONTEIRO, 2005), que os sinais voláteis são tão importantes quanto as indicações visuais na escolha do macho pela fêmea (COSTANZO & MONTEIRO, 2007), e que são os mais utilizados na avaliação da qualidade do companheiro (NIEBERDING *et al.*, 2012; VAN BERGEN *et al.*, 2013). Em *B. anynana* o uso de múltiplos sinais, como feromônio e pistas visuais, podem beneficiar a fêmea, o companheiro intraespecífico e a avaliação interespecífica (COSTANZO & MONTEIRO, 2007). Nesta espécie ocorre o fenômeno da modulação plástica mútua através de ornamentação sexual, devido às diferenças de temperatura de desenvolvimento da larva; temperatura esta que quando baixa (17°C) origina fêmea que atrai o macho e que quando alta (27°C) origina macho que atrai a fêmea (PRUDIC *et al.*, 2011). Sugere-se que a utilização de feromônios pelo macho é generalizada dentro do gênero, e que os feromônios são sinais espécie- específicos (WANG *et al.*, 2014). Em *Heliconius*, as androcônias alares foram recentemente estudadas e suas escamas identificadas em machos da *Heliconius melpomene* (Linnaeus, 1758) (Nymphalidae, Heliconiinae), (MOORE, 2014; DARRAGH *et al.*, 2017) e *Heliconius erato* (Linnaeus, 1758) (Nymphalidae, Heliconiinae), (MOORE, 2014).

Análises químicas de dezessete espécies e subespécies de *Heliconius* (*Heliconius melpomene rosina*, *Heliconius melpomene plesseni*, *Heliconius melpomene malleti*, *Heliconius cydno chioneus*, *Heliconius cydno zelinde*, *Heliconius cydno weymeri* f. *gustavi*, *Heliconius cydno weymeri* f. *weymeri*, *Heliconius hecale melicerta*, *Heliconius doris*, *Heliconius sara*, *Heliconius ismenius*, *Heliconius erato demophoon*, *Heliconius timareta florenzia*, *Heliconius elevatus*, *Heliconius pardalinus*, *Heliconius himera* e híbridos selvagens inter-raciais de *H. cydno* (Doubleday, 1847) mostraram que os compostos identificados podem desempenhar um papel na escolha do companheiro, ajudando assim a manter a integridade das espécies em um gênero de borboleta caracterizada por profundo interespecífico fluxo de genes (MANN *et al.*, 2017).

### **Funções da androcônia**

A função mais facilmente perceptível, em estudos dos feromônios liberados pela androcônia na ordem Lepidoptera, é a de tornar a fêmea mais receptiva aos



avanços do macho e com isso aumentar as chances de um acasalamento bem-sucedido; e possivelmente também servir como um componente de reconhecimento intra e interespecífico a curta distância (ANDERSSON *et al.*, 2007; NIEBERDING *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2014). Existem outras funções que poderiam explicar a ocorrência generalizada de feromônios no macho de borboletas, como fornecer informações confiáveis sobre a qualidade do macho e assim tornar a fêmea protagonista na escolha do companheiro (DUSSOURD *et al.*, 1991; IYENGAR *et al.*, 2001), facilitar a identificação dos sexos durante o namoro e identificar machos entre machos; em espécies nas quais os machos apresentam comportamento de defesa de território de acasalamento (KEMP & WIKLUND, 2001).

Andersson *et al.* (2007) ressaltam que as funções das androcônia não são mutuamente exclusivas, e, que as quatro primeiras funções, aqui citadas, poderiam ser importantes para uma fêmea quando em situações de corte; evidenciando-se que o estímulo sexual e o comportamento de aceitação da fêmea estão sob a influência de um feromônio sexual do macho, que deve ser simultaneamente espécie-específico e sexo-específico, pois existe uma forte seleção contra acasalamentos interespecíficos. Os machos de diferentes espécies, observados em situações de corte, utilizam ativamente seus dispositivos de liberação de feromônio quando estão cortejando uma fêmea (ANDERSSON, 1994).

### **A origem dos feromônios atrativos em Nymphalidae**

A diversidade química de componentes dos feromônios afrodisíacos dos machos acompanha a diversidade de borboletas existentes. Alguns comprovadamente derivados de plantas como os derivados de alcaloides, terpenóides, aromáticos ou ácidos carboxílicos e outros que necessitam de maiores análises. Devido a variedade de *bouquets* odoríferos dos feromônios dos machos acredita-se que as vias biossintéticas subjacentes evoluíram múltiplas vezes, independentemente, durante a trajetória evolutiva (LIÉNARD *et al.*, 2014).

Na família Nymphalidae, como por exemplo, algumas borboletas da subfamília Danainae (NISHIDA *et al.*, 1996; STRITZKE *et al.*, 2002; SCHULZ *et al.*, 1993, 2004) e algumas *Heliconius* spp., da subfamília Heliconiinae (SCHULZ *et al.*, 2007, 2008) foram investigadas com relação à origem dos feromônios afrodisíacos. O macho de Danainae procura ativamente, captura, e metaboliza os alcaloides de plantas que vão dar origem aos afrodisíacos (BOPPRÉ, 1990). Em Ithomiini (Lepidoptera,

Danainae) a comunicação química se dá através de franjas das asas, que podem ser expostas independentemente da presença de fêmeas, com a utilização de compostos derivados de alcaloides pirrolizidínicos (Aps). Dentre os Aps, na família Arctiidae (Heterocera) e na subfamília Danainae, por exemplo, a licopsamina é armazenada para proteção contra predadores. Ainda, muitos a utilizam como precursor de feromônios do macho (BROWN, 1984; BOPPRÉ, 1986; TRIGO *et al.*, 1994). Os gêneros *Tithorea* Doubleday, 1847 (Danainae, Ithomiini) e *Tellervo* Kirby, 1894 (Danainae, Tellervini) sequestram Aps na fase larval durante a alimentação (TRIGO & BROWN, 1990; ORR *et al.*, 1996).

*Idea leuconoe* possui uma planta hospedeira que contém uma série de Aps (ABE & YAMAUCHI 1982), e o adulto aloja grandes quantidades de componentes alcaloides sequestrados em seus tecidos corporais (NISHIDA *et al.*, 1991). Deste modo, ao contrário da maioria das outras espécies de Danainae, os machos adultos não procuram Aps.

### **Composição química dos semioquímicos afrodisíacos em Lepidoptera**

Nas fêmeas os feromônios consistem majoritariamente em alcoóis, aldeídos e acetatos graxos de cadeia linear. Para ilustrar, um exemplo tradicional é o atrativo sexual produzido por fêmeas de *B. mori* o (*E,Z*)-10,12-hexadecadien-1-ol (bombicol) (BUTENANDT *et al.*, 1959; BUTENANDT & HECKER, 1961) que é secretado juntamente com vestígios do respectivo isômero, (*E,E*) (KASANG *et al.*, 1978a) e o aldeído de configuração (*E,Z*), o bombical (KASANG *et al.*, 1978b). O Bombicol sozinho é capaz de elicitar um padrão de comportamento sexual da mariposa macho que é parcialmente bloqueado se o *bombicol* for liberado juntamente com o bombical (KAISLING *et al.*, 1978). A função biológica da inibição por *bombical* é desconhecida. Curiosamente as fêmeas de *B. mori* não são capazes de cheirar seu próprio feromônio embora existam espécies de mariposas nas quais as fêmeas cheiram o seu próprio feromônio (SCHNEIDER *et al.*, 1988). Em *B. mori*, um neurônio é adaptado para o ácido benzoico (HEINBOCKEL & KAISLING, 1996; PRIESNER, 1979; DE BRITO SANCHEZ, 2000; DE BRITO SANCHEZ & KAISLING, 2005), outro neurônio é mais sensível ao norterpeno 2,6-dimetilhept-5-en-1-ol, e dez vezes menos sensível ao linalol (BARROZO & KAISLING, 2002; PRIESNER, 1979). O ácido benzoico é emitido a partir da secreção intestinal (mecônio) de mariposas recentemente emergidas, a origem natural do norterpeno é desconhecida, e o seu significado para as fêmeas *B. mori* não foi explorado (ZIESMANN *et al.*, 2000).

Outro exemplo é o citral (uma mistura de Neral e Geranial) em *P. napi* (BERGSTRÖM & LUNDGREN, 1973), que é emitido quando os machos estão interagindo em voo com machos coespecíficos (ANDERSSON *et al.*, 2000) e com fêmeas, como demonstrado através de análises eletroantenográficas por Larsdotter-Mellstrom *et al.* (2016).

Os compostos como danaidona, hidroxidanaidal e danaidal, são frequentemente utilizados pelas espécies da subfamília Danainae e família Arctiidae como feromônios, muitas vezes ocorrendo como misturas de dois componentes. Na maioria das espécies, o hydroxydanaidal está presente; outros compostos frequentemente utilizados são danaidona e o danaidal (SCHULZ *et al.*, 1993; HARTMANN & OBER, 2000). A base de dados de feromônios e semioquímicos, Pherobase (EL-SAYED, 2018) apresenta ainda a danaidona como feromônio de *Lycorea ceres ceres* (Cramer) (Nymphalidae, Lycoreinae) (MEINWALD *et al.*, 1966). A fórmula estrutural dos compostos acima citados e outros compostos aqui citados podem ser acessados no QUADRO 1.

QUADRO 1 – FÓRMULAS ESTRUTURAIS DE COMPOSTOS CITADOS NO TEXTO

Nº	Fórmula estrutural	Nome do composto	Nº	Fórmula estrutural	Nome do composto
1		Bombicol ((E,Z)-10,12-hexadecadien-1-ol)	12		(2R,6R,10R)-6,10,14-trimethylpentadecan-2-ol
2		Linalol	13		(Z)-9-tetradecenol (Z-9-14:OH)
3		(E)-β-farneseno	14		(Z)-9-octadecenal
4		Ácido benzóico	15		octadecanal
5		2,6-dimetilhept-5-en-1-ol	16		henicosano
6		Citral	17		(Z)-11-icosenal
7		Danaidona	18		icosanal
8		Hidroxidanaidal	19		(Z)-13-docosenal
9		Danaidal	20		Licopsamina
10		Intermedina	21		Rinderina
11		Echinatina			

FONTE: Prof. Dr. Diogo Montes Vidal e o autor, 2018.

*Idea leuconoe* Erichson, 1834, exhibe “hair-pencils” durante a corte, que contêm uma mistura de alcaloides dihidropirrolizínicos, aromáticos, terpenos,

hidrocarbonetos e uma série de  $\gamma$ -lactonas (NISHIDA *et al.*, 1996; SCHULZ & NISHIDA, 1996; STRITZKE *et al.*, 2002). Em Ithomiinae, foram encontrados o hidroxidanaidol e dihidropirrolizinato de metila e lactonas, entre outros compostos (EDGAR *et al.*, 1976; SCHULZ *et al.*, 1988; SCHULZ, 1992). A licopsamina é o principal Ap armazenado por Ithomiinae (TRIGO *et al.*, 1996). Ela apresenta a mesma configuração absoluta na sua parte necina ácida e é provável que seja o precursor biogenético direto de alguns compostos. Intermedina, rinderina, e echinatina, também são coletados por adultos Ithomiinae e são transformados pelas borboletas no suposto precursor de feromônio licopsamina (TRIGO *et al.*, 1994).

O feromônio do macho de *B. anynana* é formado por uma mistura de um composto derivado de fitol, o (2*R*,6*R*,10*R*)-6,10,14-trimetilpentadecan-2-ol em conjunto com o derivado de ácido graxo (AG) (*Z*)-9-tetradecenol (*Z*-9-14:OH) e hexadecanal (16:Ald). Este *bouquet* odorífero do feromônio é liberado durante a exposição do corte ritualizada de dois conjuntos de estruturas de escamas modificadas, as androcônia localizadas nas asas anteriores e posteriores. Os compostos *Z*-9-14:OH e 16:Ald, são estruturalmente idênticos aos conhecidos componentes de feromônios sexuais de fêmeas de mariposas; entretanto, sua origem permanece incerta devido possivelmente à múltiplas rotas alternativas que levam a estas estruturas químicas (LIÉNARD *et al.*, 2014). A base de dados de feromônios e semioquímicos, Pherobase (EL-SAYED, 2018) apresenta para dezesseis espécies do gênero *Bicyclus*, os compostos afrodisíacos principais das asas do macho, que variam entre alcoóis e acetonas (HEDENSTRÖM *et al.*, 2015) e ésteres (WANG *et al.*, 2014).

*Heliconius melpomene* (Linnaeus, 1758) (Nymphalidae, Heliconiinae) possuem seis componentes químicos como potenciais feromônios sexuais do macho, que foram encontrados em extratos da asa a partir de amostras obtidas do Equador. Os compostos são o (*Z*)-9-octadecenal, octadecanal, henicosano, (*Z*)-11-icosenal, icosanal e (*Z*)-13-docosenal. Fora destes seis compostos, unicamente o alceno henicosano foi encontrado em todas as regiões da asa, mas (*Z*)-9-octadecenal, octadecanal, (*Z*)-11-icosenal, icosanal e (*Z*)-13-docosenal foram restritas à região de escamas androconiais da asa (DARRAGH *et al.*, 2017).

Recentemente dezessete espécies e subespécies de *Heliconius* foram utilizadas em um trabalho de identificação de compostos e observação sobre a diversidade na química dos compostos voláteis presentes na androcônia das asas do macho comparada com a diversidade dos padrões de cores miméticas das asas das

espécies (MANN *et al.*, 2017). Observou-se que a maior parte dos compostos identificados se originam de ácidos graxos precursores comuns, incluindo aldeídos, alcoóis, acetatos ou ésteres preferencialmente com uma cadeia C18 e C20, juntamente com alguns alcanos. Cada espécie possui uma mistura específica de compostos. Assim por exemplo, o octadecanal é característico para *H. melpomene*, com uma variação na composição entre os indivíduos. Análises de grupos de ocorrência dos compostos de buquês individuais e análises baseadas em motivos biossintéticos, como o grupo funcional, o comprimento da cadeia, ou modificação básica do carbono-espinha dorsal foram usadas para revelar padrões estruturais. Com isso constatou-se que os pares de miméticos alopátricos (que são separados geograficamente) contêm diferentes buquês aromáticos, mas também alguns compostos em comum, enquanto que espécies simpátricas (que vivem em uma mesma área geográfica), miméticas e não miméticas, possuem mais distinção na composição dos compostos.

### **Os comportamentos de corte em Lepidoptera**

Nos rituais de acasalamento existem os comportamentos de corte ou namoro onde cada sinal emitido por um indivíduo contribui para a atratividade do outro. Em lepidóptera são múltiplos sinais que irão atuar em diferentes especificidades sensoriais. Adultos irão determinar suas preferências para alguns destes sinais no pré-acasalamento juvenil ou na experiência social com a maturidade sexual individual, durante os quais são aprendidos (COSTANZO & MONTEIRO, 2007).

Em *Pieris napi* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera, Pieridae), as androcônias do macho liberam feromônio que é disperso de forma passiva durante o voo, enquanto em outras espécies de mariposas e borboletas as androcônias são incorporadas ativamente no namoro. Ainda em *P. napi*, como em outras espécies da família Pieridae como *Pieris rapae* Linnaeus, 1758, *Pieris brassicae* (Linnaeus, 1758) e *Anthocharis cardamines* (Linnaeus, 1758), fêmeas não receptivas reagem à corte masculina, estendendo suas asas lateralmente e levantando o seu abdome no ar, desempenhando a chamada “postura de recusa do companheiro” (OBARA, 1964; WIKLUND & FORSBERG, 1985; FORSBERG & WIKLUND, 1989). Este comportamento da fêmea parece ter duas funções: fazer com que seja fisicamente difícil para um macho formar um par com uma fêmea que está sendo cortejada e disseminar voláteis que podem ser facilmente percebidos pelo macho cortejador; pois muitos machos parecem ser capazes de distinguir entre fêmeas virgens e acasaladas. Em *P. napi*, *P. rapae* e *P. brassicae* diferentes voláteis são liberados pelas fêmeas virgens e acasaladas quando

exibem a postura de recusa do companheiro (ANDERSSON *et al.*, 2000; ANDERSSON *et al.*, 2003). Fêmeas virgens e acasaladas primeiramente apresentam a postura de recusa do companheiro quando abordadas por um macho, mas quando uma fêmea aceita o cortejo do macho ela sinaliza sua receptividade, fechando as asas e acedendo (FORSBERG & WIKLUND, 1989). Ao perceber este sinal, o macho cortejador pousa ao lado da fêmea, curva seu abdômen para o lado para fazer contato genital com a fêmea, e, geralmente após, leva a fêmea em um curto voo pós-nupcial. Em *P. napi*, os machos emitem um forte cheiro de citral (BERGSTRÖM & LUNDGREN, 1973). Este odor é emitido quando os machos estão interagindo em voo com machos coespecíficos (ANDERSSON *et al.*, 2000). Mais tarde Larsdotter-Mellstrom *et al.* (2016) utilizaram análises eletroantegráficas para demonstrar que as fêmeas são mais sensíveis que os machos ao citral, uma dúvida levantada no trabalho de Andersson *et al.* (2007).

Os “*hair-pencils*” abdominais de machos de *Idea leuconoe* Erichson, 1834 (Nymphalidae, Danainae) são formados por um par de pincéis grandes e um par de pequenas escovas, cada par alojado de forma independente em sua própria bainha. Os machos evertem os “*hair-pencils*” durante a corte enquanto pairam acima de uma fêmea, disseminando, assim, os seus produtos químicos voláteis. Estas escovas abdominais ocasionalmente tocam as antenas da fêmea ou uma parte do corpo, e, em seguida a fêmea aceita o macho e a cópula ocorre (Nishida *et al.* 1996). Os componentes químicos do feromônio dos “*hair-pencils*” sugerem um papel decisivo do macho na corte, como foi mostrado na borboleta rainha, *Danaus gilippus* (Cramer, [1775]) (Nymphalidae, Danainae) (PLISKE & EISNER, 1969). Em *I. leuconoe* os machos também exibem “*hair-pencils*” após ataques de predadores, disseminando um odor semelhante ao do fenol. Com isto sugere-se uma função secundária dos voláteis emitidos pelo *hair-pencil* como repelentes ou como um odor aposemático em conjunto com os alcaloides pirrolizidínicos sequestrados no corpo. Embora os machos de *I. leuconoe* não mostrarem afinidade para alcaloides pirrolizidínicos, são fortemente atraídos para algumas substâncias fenólicas, que implica em uma associação farmacológica diferente de todas as outras espécies da subfamília Danaine (NISHIDA *et al.*, 1996).

Em *Hipparchia semele* (Linnaeus, 1758) (Nymphalidae, Satyrinae), o macho toma as antenas do sexo feminino entre suas asas, fazendo-as entrar em contato com a androcônia e com os feromônios que as suas escamas carregam (TINBERGEN *et al.*, 1942; ANDERSSON *et al.*, 2007). Em *Danaus gilippus berenice* (Cramer, 1779) o



macho executa um voo de corte logo acima da fêmea durante o qual ele movimenta seus “*hair-pencils*” e encharca a fêmea com “pó do amor” (BROWER *et al.*, 1965). O “pó do amor” são partículas finas produzidas por pelos cuticulares, impregnadas com o feromônio do macho, que aderem às antenas da fêmea, fornecendo uma fonte de longa duração do estímulo que faz com que a fêmea se torne receptiva para a cópula (BOPPRÉ & VANE-WRIGHT, 1989). De um modo similar, em *Danaus plexippus* (Linnaeus, 1758) (Nymphalidae, Danainae), as monarcas-macho, primeiro perseguem as fêmeas no ar, em seguida, com os movimentos aéreos de seus “*hair-pencils*”, realizam uma queda aérea pouco antes da cópula (PLISKE, 1974).

Experimentos de escolha comportamental com fêmeas de *H. melpomene*, *H. erato* e *H. timareta* mostraram que os machos coespecíficos são discriminados fortemente quando têm sua região androconial bloqueada experimentalmente (DARRAG *et al.*, 2017). Provavelmente a faixa de sobreposição desempenha um papel durante a corte, pois durante a corte do macho de *H. erato phyllis*, a faixa de sobreposição fica claramente visível, devido aos movimentos vibratórios das asas dos machos sobre a fêmea, que expõem a androcônia (KLEIN & DE ARAUJO, 2010).

### **Particularidades da androcônia no gênero *Heliconius***

De acordo com Moore (2014), em *H. erato* e *H. melpomene* as androcônias são encontradas nas asas posteriores, na faixa de sobreposição, uma área de escamas castanho-prateadas-brilhantes na margem costal, que pode ser analisada em vista dorsal. A mesma região também foi objeto de estudo de semioquímicos e morfologia por Mann *et al.* (2017) e Darrag *et al.* (2017). Aymone *et al.* (2013) examinaram a ultraestrutura das escamas não androconiais encontradas em *H. erato phyllis*. Os autores concluíram que a faixa de sobreposição poderia servir como uma ferramenta útil para a compreensão do desenvolvimento, pigmentação e ultraestrutura das escamas, que são conectados. A concentração de androconium nesta área pode estar associada a fatores de desenvolvimento ou seletivos que controlam a evolução da faixa de sobreposição, mas estes permanecem indefinidos.

Müller (1912) descreve as escamas androconiais de *Heliconius apseudes*, *Heliconius eucrate* e *Heliconius besckei*, entre outros Nymphalidae, como bastante variáveis, na face superior da asa posterior, perto da margem costal e particularmente ao longo da costal e subcostal. veias. Eles são inseridos entre as escamas comuns, com a margem apical geralmente fortemente arqueada com uma franja densa, uma



haste fina com revestimento fino e flácido e um soquete. As cavidades são muito maiores que as de outras escamas, esféricas e com uma margem escura, como se contivesse alguma substância fortemente refrativa, que em espécimes recém-surgidos não existe. Barth (1952) procurou localizar e medir as escamas androconiais encontradas em ambas as asas de *Heliconius phyllis* e *Heliconius narcaea*.

Acredita-se que a maioria das espécies de *Heliconius* tenha androconias alares, embora os estudos sobre a mecânica de corte e cópula sejam escassos (MOORE, 2014).

## 1.2 A GUARDA E O ACASALAMENTO PUPAL

O comportamento dos machos de ficar de guarda sobre pupas fêmeas até a sua emergência, chegando a acasalar quando esta ainda está na pupa são fenômenos pouco estudados. Segundo Beebe *et al.* (1960) as pupas dos Heliconiinae apresentam grande variedade na forma e ornamentação. As cores variam de marrom escuro a quase branco, as veias da asa são frequentemente marcadas com pigmento escuro, e manchas douradas são características habituais das partes dorsais do tórax e abdome, são caracteres taxonômicos identificáveis. As pupas, em Nymphalidae, estão suspensas pela ponta do cremaster (uma série de pequenos ganchos ou apenas um único gancho maior que se prende a um bloco de seda produzido pela larva de último instar no local da pupação) e apresentam estruturas superficiais como tubérculos e espinhos. A cabeça apresenta um par de projeções que vão desde tubérculos pequenos a apêndices longos, achatados e recortados. Nos segmentos anais, na região ventral pode-se observar sulcos, que de acordo com o tamanho e posição permitem a sexagem das pupas.

O acasalamento pupal se realiza após a guarda-pupal das pupas fêmeas pelos machos de heliconíneos, onde alguns machos ficam pousados sobre a pupa aguardando a emergência da fêmea ou a sua maturação. Assim este sistema de acasalamento animal elege qual o sexo que tem mais poder na escolha do parceiro (SHUSTER, 2009), e este equilíbrio irá influenciar as características que estão sob seleção sexual e ajuizar conflitos entre os sexos. O sistema de acasalamento das borboletas *Heliconius* forma dois grupos: Aproximadamente metade das espécies é considerada de acasalamento adulto, no qual machos abordam fêmeas adultas, que podem aceitar ou rejeitar a cópula (RUTOWSKI, 1984; SCOTT, 1972; WALTERS *et al.*, 2012). No segundo grupo estão os heliconíneos com um sistema de acasalamento

conhecido como de acasalamento pupal. Neste sistema, o macho copula com a fêmea recém-emergida (DEINERT *et al.*, 1994; Edwards, 1881; GILBERT, 1975, 1976, 1991) ou inicia a cópula antes da fêmea emergir completamente. No último caso o macho quebra o estojo da pupa e insere o abdômen para iniciar o acasalamento (DEINERT *et al.*, 1994; GILBERT, 1975; SOURAKOV 2008). Os machos podem realizar a guarda pré-copulatória (pupal ou pré-acasalamento), onde podem passar dias sobre as pupas e competir com outros machos por espaço e acesso à fêmea (DEINERT *et al.*, 1994; EDWARDS 1881). Tanto no acasalamento pupal antes ou após a emergência da fêmea temos exemplos de coerção sexual (CLUTTON-BROCK & PARKER, 1995) pois as fêmeas não podem rejeitar as tentativas de acasalamento do macho.

Estrada *et al.* (2010) pesquisaram a guarda pré-copulatória em pupas fêmeas em *Heliconius charithonia* (Linnaeus, Nymphalidae) procurando identificar as pistas que permitem que os machos determinem a maturidade e o reconhecimento sexual das pupas fêmeas. A guarda pupal pode ocorrer quando a pupa fêmea exibe a cor castanho-claro ou quando está translúcida, revelando as cores das asas (habituais em ambos os sexos) e o corpo do adulto (ESTRADA, 2009). Dois voláteis apareceram consistentemente em apenas um dos sexos: o monoterpene linalol foi encontrado exclusivamente em pupas tardias de machos, e o óxido de linalol (furanóide) que foi liberado por pupas tardias de fêmeas. Foi descoberto que os machos reconhecem pupas fêmeas usando pistas voláteis de monoterpenos sexo-específicos produzidos no final do desenvolvimento pupal de ambos os sexos (ESTRADA *et al.*, 2010).

O presente estudo abrange três lepidópteros, *H. erato phyllis*, *Heliconius ethilla narcaea* e *H. besckei*, encontrados em uma grande área comum da Mata Atlântica, Brasil, e apresentando uma interação comportamental em observações de campo. Os estudos morfológicos apresentados aqui complementam os estudos de Müller (1912) para as espécies *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei*, e de Barth (1952) para as espécies *H. erato phyllis* e *H. ethilla narcaea*. Estes lepidópteros foram estudados neste presente trabalho, por meio de técnicas de microscopia ótica padrão (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de metodologia de ecologia química.

### 1.3 OBJETIVOS

#### 1.3.1 Objetivo geral

Investigar a composição química dos voláteis, a morfologia e a etologia relacionadas à androcônia alar e pupas de *Heliconius erato phyllis*, *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei*.

#### 1.3.2 Os objetivos específicos

Coletar, extrair e identificar glândulas e feromônios relacionados aos lepidópteros.

Determinar os compostos presentes nos bouquets afrodisíacos emitidos pela androcônia alar e pupas.

Analisar os extratos em CG / CG-EM.

Realizar análise qualitativa pelos índices de retenção e índice de Kovats e importância biológica.

Realizar análise quantitativa dos compostos nas androcônias de machos excitados e não excitados.

Determinar a morfologia dos órgãos e glândulas envolvidas na produção dos voláteis.

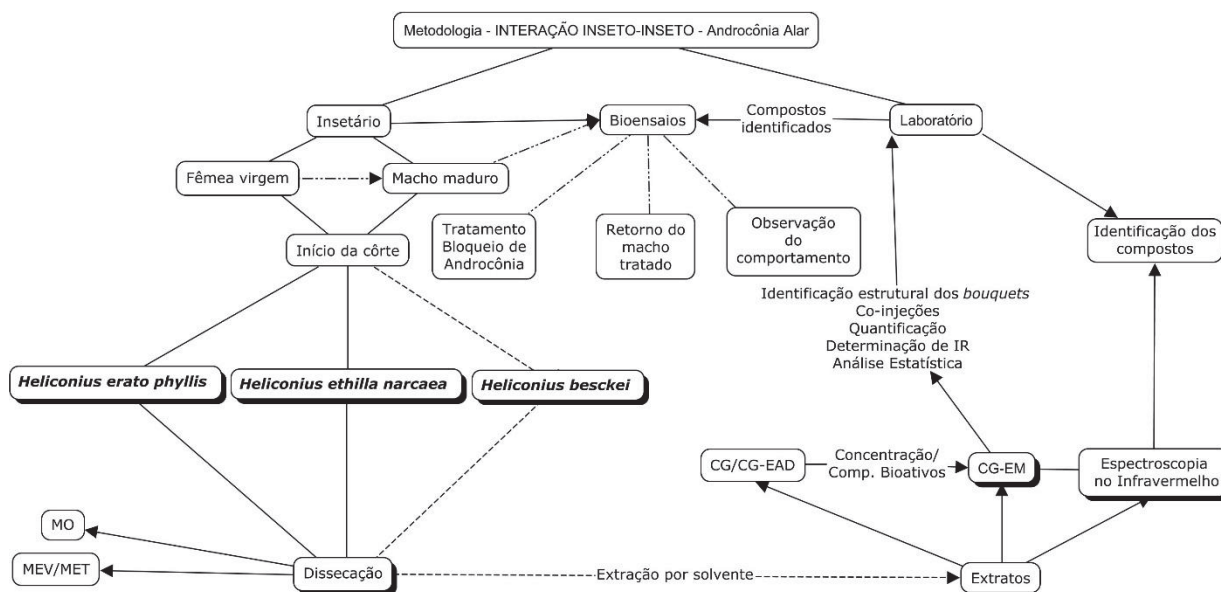
Analisar os extratos em CG, CG-EM e EIV.

## 2 METODOLOGIA

No insetário citado no capítulo I, após a coleta e adaptação de fêmeas para a postura de ovos, obtenção das larvas, e de adultos virgens, iniciaram-se os procedimentos para obtenção do comportamento de início da corte, dissecação das faixas de sobreposição das asas, preparação dos extratos, as análises químicas, e morfológicas. A área de reprodução foi utilizada por uma espécie ou subespécie separadamente. *Heliconius besckei* foi analisada parcialmente.

A metodologia aqui relatada encontra-se abaixo, no resumo esquemático (FIGURA 12), onde as linhas tracejadas correspondem a etapas parcialmente concluídas, e as linhas tracejadas e duplamente pontilhadas correspondem a etapas não realizadas.

FIGURA 12 - RESUMO ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DA ANDROCÔNIA DAS ASAS DOS LEPIDÓPTEROS



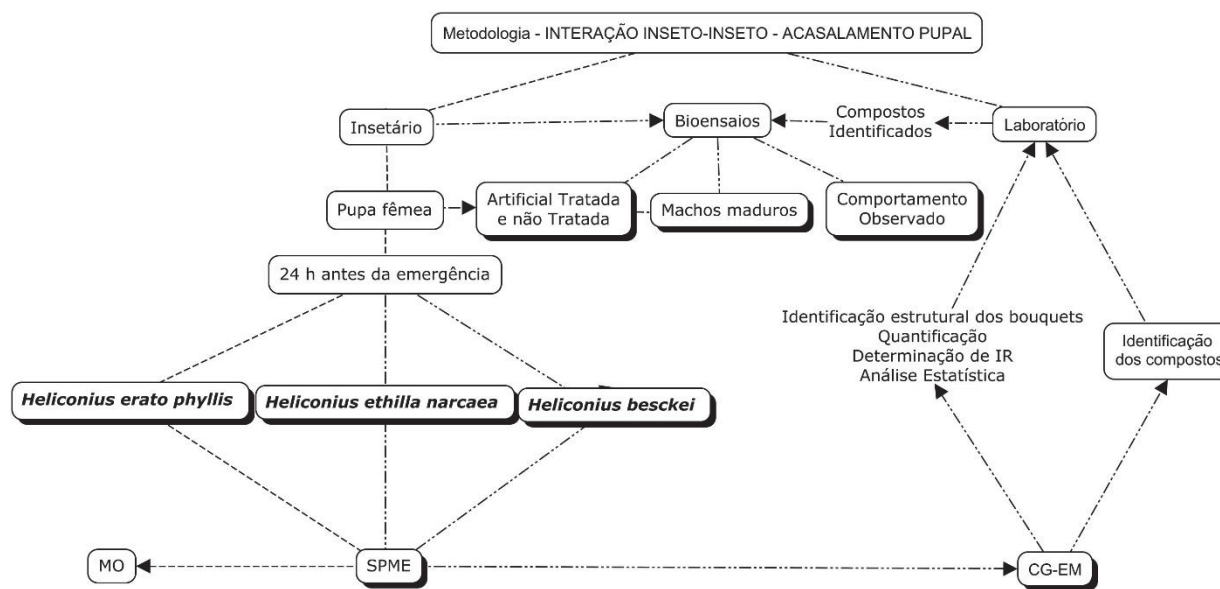
FONTE: O autor (2017).

Após a obtenção das pupas, iniciaram-se os procedimentos para obtenção dos voláteis 24 h antes da emergência da fêmea. A pupa prestes a emergir é identificada pela sua transparência, que permite a observação das cores das asas. Somente a subespécie *H. erato phyllis* foi analisada parcialmente.

A metodologia aqui relatada encontra-se abaixo, no resumo esquemático (FIGURA 13), onde as linhas tracejadas correspondem a etapas parcialmente

concluídas, e as linhas tracejadas e duplamente pontilhadas correspondem a etapas não realizadas.

FIGURA 13 - RESUMO ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DO ACASALAMENTO PUPAL DOS LEPIDÓPTEROS



FONTE: O autor (2017).

## 2.1. CRIAÇÃO DE *Heliconius erato phyllis*, *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei*

Objetivo: Obtenção de adultos e imaturos (pupas) para coleta de voláteis.

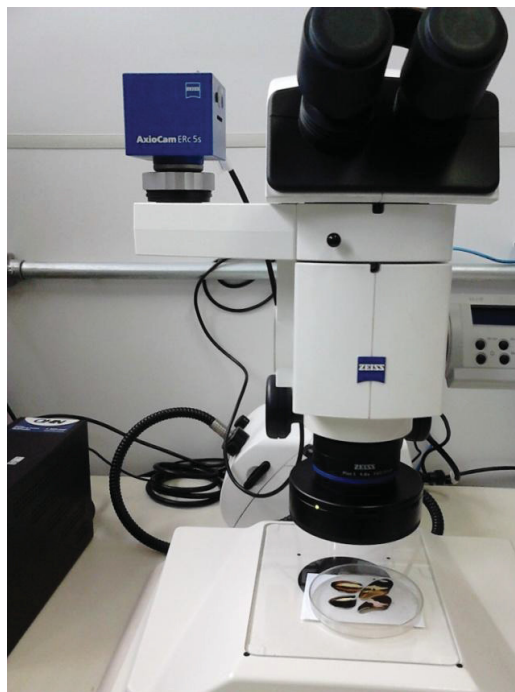
Borboletas adultas foram coletadas na floresta nativa do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Parque Barigüi e Parque Barreirinha, em Curitiba, Paraná, Brasil. Através da separação de machos e fêmeas e do controle da prole oriunda dos acasalamentos, a variabilidade genética dos lepidópteros foi assegurada. Foram tomados todos os cuidados higiênicos na manipulação dos espécimes para não ocorresse contaminação por agentes externos. Para a criação e manipulação dos adultos, um insetário revestido com Sombrite®, que permite a passagem de 30% da luz solar direta, foi utilizado como ambiente seminatural. Dentro do insetário, potes com *P. edulis*, *Passiflora actinia* Hooker, 1943, foram utilizados como plantas hospedeiras de oviposição. *Impatiens walleriana* Hook, e recipientes com dieta artificial (BORGES *et al.* 2010), foram utilizados como fonte alimentar.

## 2.2. MORFOLOGIA DAS ASAS

Objetivo: Determinar a morfologia das veias e faixa de sobreposição das asas.

As asas, de quinze exemplares, foram dissecadas e colocadas em hipoclorito de sódio a 20%, e após o clareamento foram desidratadas em álcool GL 99% e secas (FIGURA 14). A análise das veias foi realizada utilizando um estereomicroscópio e ilustrações foram obtidas em câmera clara (estereomicroscópio Zeiss Stemi SV6). Imagens de asas do macho e da fêmea foram obtidas pela câmera LG10.

FIGURA 14 – DISSECAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES MORFOLÓGIAS E QUÍMICAS



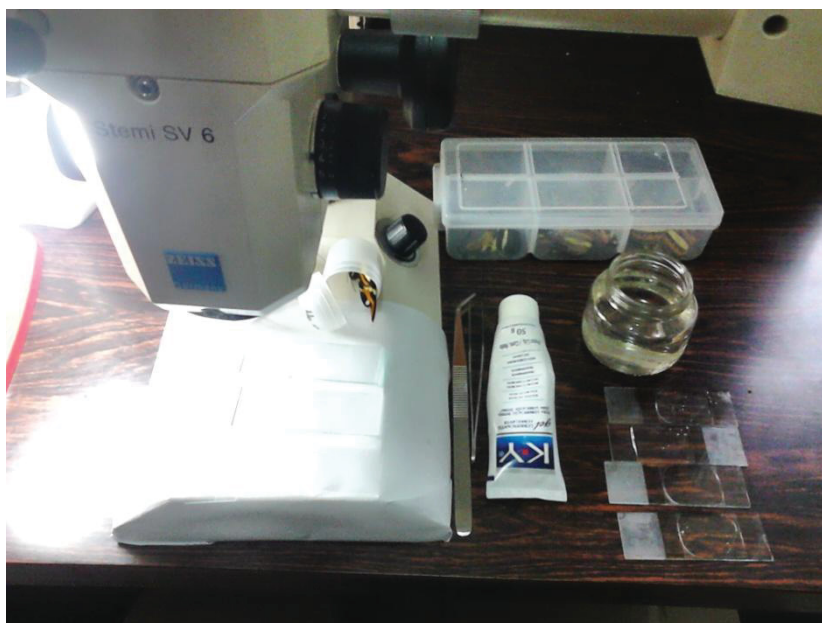
FONTE: O autor (2017).

### 2.3. MORFOLOGIA DAS ESCAMAS ANDROCONIAIS

Objetivo: Determinar a morfologia da glândula, da cavidade cuticular e da escama que compõem a unidade produtora de odor da androcônia alar dos lepidópteros através de MO, MEV e MET e das pupas em MO.

A ultraestrutura tegumentar das unidades produtoras de odor (cada uma consistindo de uma célula glandular, uma cavidade cuticular e uma escama) foi estudada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. As asas foram dissecadas e secas em um forno (8h aproximadamente) e imagens capturadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6360-LV e TESCAN VEGA3 LMU. Escamas foram coletadas de quinze espécimes raspando-se as diferentes áreas da asa. Eles foram colocados em uma lâmina seca pré-tratada com KY®. Uma gota de KY® foi adicionada na lâmina que foi coberta por lamínula (FIGURA 15) e fotografada com um microscópio OLIMPUS BX51, usando o software CELL F®. Quinze escamas androconiais de cada espécie foram medidas a partir da base lateral da lâmina até a maior borda das franjas (comprimento) e a maior borda lateral (largura) utilizando o software ImageJ®. O programa R® foi utilizado para análise estatística.

FIGURA 15 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES MORFOLÓGIAS EM MICROSCÓPIO



FONTE: O autor (2017).

As escamas androconiais foram seccionadas transversalmente sob estereomicroscópio com uma lâmina de bisturi e posteriormente posicionadas



individualmente em fitas adesivas de cobre com o auxílio de um microalfinete entomológico. As secções foram examinadas e fotografadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6360-LV e TESCAN VEGA3 LMU.

Para análises de microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram desidratadas em um secador de pontos críticos Baldec CPD030, montadas com fita dupla-face em pontas de metal e revestidas com ouro em um equipamento de revestimento por pulverização Bal-tec SCD050. Os espécimes foram examinados e as imagens capturadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6360-LV e TESCAN VEGA3 LMU. Para microscopia eletrônica de transmissão, os espécimes foram preservados em uma mistura de 1% de paraformaldeído e 2% de glutaraldeído em um tampão cacodilato 0,1 M. O material foi então lavado no mesmo tampão, pós-fixado com tetróxido de ósmio 1% e tampão cacodilato 0,1M por 1 h, desidratado em uma série ascendente de álcool, pré-embebido em resina epon e óxido de propileno (1:1), e finalmente incorporado resina epon (resina Epon B212). O material foi então polimerizado por 72h a 60 ° C. Cortes semifinos (2 µm) foram obtidos com ultramicrotomo Leica UCT, utilizando facas de vidro, e coradas com azul de toluidina a 1% em tetraborato de sódio a 1%. Cortes ultrafinos (70 nm) foram obtidas com o mesmo ultramicrotomo, empregando uma navalha de diamante (Diatome). Estes cortes foram contrastados com 5% de acetato de uranila, seguido por 1% de citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). Os cortes ultrafinos foram examinados usando um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1200 EX II.

As pupas foram fotografadas no espaço destinado ao projeto Taxonline, Departamento de Zoologia, UFPR, em estereomicroscópio Leica® MZ16, fotografias com montagem de imagens sequenciais em diferentes planos focais, com câmera fotográfica Leica® DFC 500, módulo Leica® las 3D view e las montage.

## 2.4 EXTRAÇÃO POR SOLVENTE

Objetivo: Obter extratos da faixa de sobreposição das asas dos lepidópteros.

Uma fêmea virgem é colocada em área de acasalamento com dois machos maduros. Após o início do namoro, os adultos são separados e as suas bandas de sobreposição (das asas anteriores e posteriores) são dissecadas e colocadas em hexano (200 µL), durante 45 min, em frasco de 1,5 ml. Um padrão interno (PI) tetradecano, 100ppm, 5µL/extrato, foi adicionado ao extrato final. O extrato foi quantificado com base na área do pico PI. Foram realizadas 10 repetições e foram



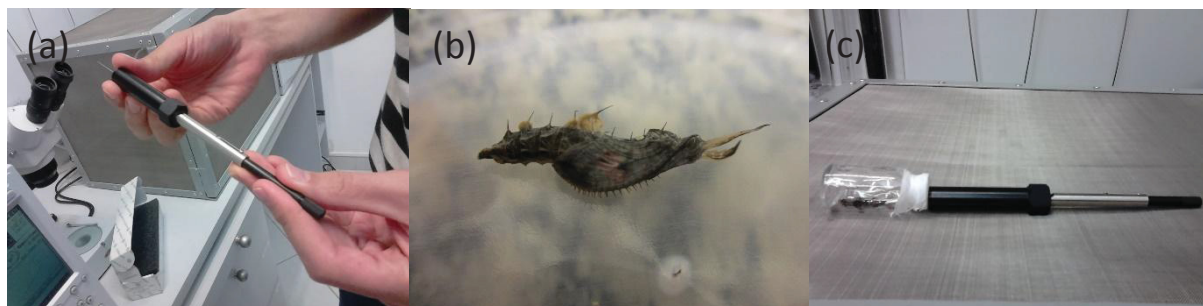
quantificados quatro (4) extratos de machos adultos excitados e não excitados para cada espécie e subespécie de lepidóptero.

## 2.5 MICROEXTRAÇÃO POR FASE SÓLIDA (SPME)

Objetivo: Extrair e obter análises qualitativas iniciais dos compostos extraídos por SPME.

Uma pupa, 24h antes da emergência, é colocada em frasco de vidro de 4 ml isolado com fita veda rosca, no qual insere-se através de um orifício a ponta do extrator de microextração em fase sólida (SPME) com 65 milímetros de fibra de polidimetil siloxano/divinil benzeno (Supelco, Sigma-Aldrich Corporation). A fibra de SPME foi exposta por 5 horas (FIGURA 16). Foram realizadas três (3) repetições de pupa macho e fêmea para cada espécie e subespécie de lepidóptero.

FIGURA 16 - MICROEXTRAÇÃO POR FASE SÓLIDA (ETAPAS): (a) MICROEXTRATOR DE FASE SÓLIDA. (b) PUPA DE *Heliconius erato phyllis* 24 h ANTES DA EMERGÊNCIA. (c) UNIDADE DE EXTRAÇÃO: FRASCO COM PUPA E EXTRATOR DE SPME COM A FIBRA NO ESPAÇO INTERNO DO FRASCO



FONTE: O autor (2017).

As amostras foram analisadas imediatamente por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).

## 2.6 ANÁLISES QUÍMICAS

Objetivo: Obter análises qualitativas iniciais e quantitativas dos compostos presentes nos extratos obtidos.

Os extratos foram analisados por cromatografia em fase gasosa e cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massa (CG-EM)

equipamento Shimadzu QP 2010 Plus. O CG e o CG-EM foram equipados com uma coluna RTX-5 (30 m × 0,25 mm i.d. 0,25 mm de espessura do filme, Restek, Bellefonte, PA, EUA). Injeções de 1 µL foram realizadas no modo splitless, com uma temperatura do injetor de 250 ° C. A temperatura do forno da coluna foi mantida a 40 ° C durante 1 min, aumentada para 250 ° C a 7 ° C.min<sup>-1</sup> e mantida durante 15 min. O hélio foi o gás transportador a uma velocidade linear de 36,3 cm.s<sup>-1</sup>. Os mesmos parâmetros foram utilizados para todas as análises.

## 2.7 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

Objetivo: Obter análises qualitativas finais de identificação dos compostos.

Os compostos foram identificados por índices de Kovats (KI), comparações de espectros de massa com a literatura, coinjeções com padrões comercialmente disponíveis e espectroscopia no infravermelho (MELO *et al.*, dados não publicados).

## 2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Objetivo: Analisar estatisticamente os resultados obtidos nos experimentos.

A quantidade média de compostos das asas anteriores e posteriores do macho de *H. erato phyllis* e *H. ethilla narcaea* foram analisadas estatisticamente. Em cada análise quantitativa foram utilizados quatro espécimes. Em *H. besckei* foram obtidos somente duas amostras de macho excitado o que inviabilizou a análise estatística para esta espécie. Nos experimentos foram utilizados machos de campo e fêmeas virgens recém-emergidas ou não para as quais o macho teve comportamento de corte. Os resultados da quantificação dos compostos foram testados por análise de PCA, ANOVA e teste de Tukey. As análises foram realizadas utilizando o programa R versão 3.3.2 (R Development Core Team 2016). O cálculo do erro padrão foi realizado no Excel ®.

### 3 RESULTADOS

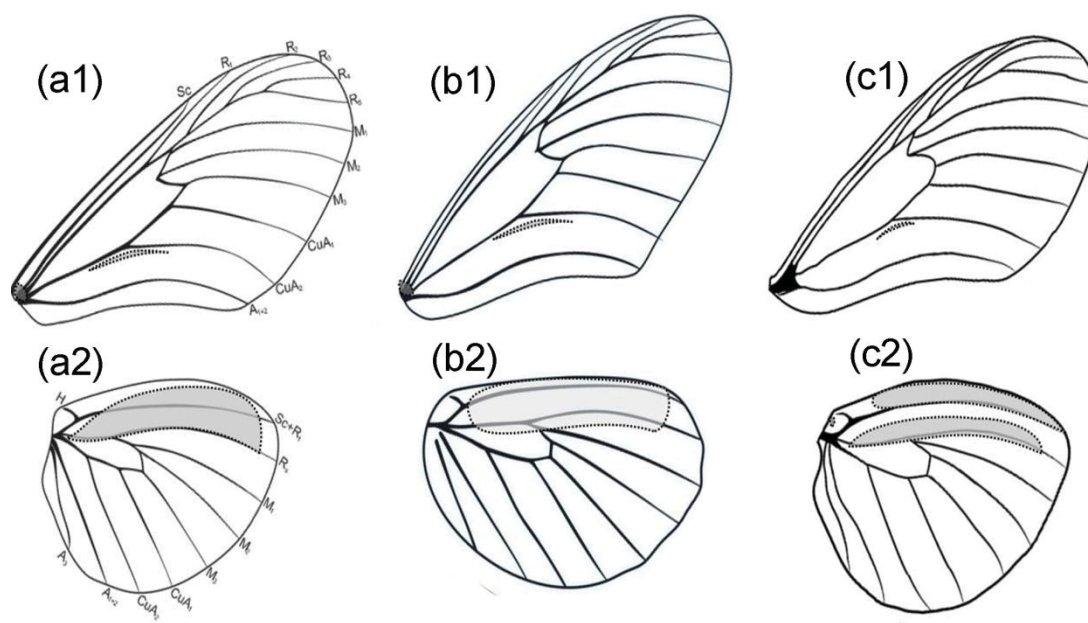
#### 3.1 ANDROCÔNIA

##### 3.1.1 Morfologia

##### 3.1.1.1 Localização das escamas androconiais

Na região ventral das asas anteriores os machos de *Heliconius erato phyllis*, *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei* possuem uma pequena área próxima à veia CuA2 com escamas androconiais (FIGURA 17 - a1, b1, c1). Na região dorsal das asas posteriores, as escamas androcônias distribuem-se da seguinte forma: *Heliconius erato phyllis* apresenta uma grande quantidade de escamas androconiais, que ocupam a parte dorsal das veias Sc + R1 e Rs, e são mais esparsas nas células Sc + R1. e Rs (FIGURA 17 - a2). *Heliconius ethilla narcaea* tem uma grande quantidade de escamas androconiais nas asas posteriores, que ocupam a parte dorsal das veias Sc + R1 e Rs, e são mais esparsas nas células Sc + R1, células Rs e parte da célula M1 (FIGURA 17 - b2). *Heliconius besckei* possui uma grande quantidade de escamas androconiais nas asas posteriores, que ocupam a parte dorsal das veias Sc + R1 e Rs e são mais esparsas nas células Sc + R1, células Rs e em uma pequena parte da célula M1 (FIGURA 17).

FIGURA 17 - LOCALIZAÇÃO DA ANDROCÔNIA (CINZA CLARO, VARIAÇÕES NO TOM, INDICAM MENOS E MAIS ESCAMAS), ESCAMAS LONGAS (CINZA ESCURO) E VEIAS RELACIONADAS EM ESPÉCIES E SUBESPÉCIES DE *Heliconius*, PRESENTES NA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO, NA REGIÃO VENTRAL DA ASA ANTERIOR E REGIÃO DORSAL A ASA POSTERIOR. (a1, a2) *Heliconius erato phyllis*. (b1, b2) *Heliconius ethilla narcaea*. (c1, c2) *Heliconius besckei*. BARRA = 5 mm. ABREVIAÇÕES: H - VEIA HUMERAL, SC - VEIA SUBCOSTAL, SC + R1 - HASTE DA VEIA SUBCOSTAL E PRIMEIRA RADIAL, R - VEIA RADIAL, R1 - PRIMEIRA VEIA RADIAL, R2 - SEGUNDA VEIA RADIAL, R3 - TERCEIRA VEIA RADIAL, R4 - TERCEIRA VEIA RADIAL, M - VEIA MEDIANA, M1 - PRIMEIRA VEIA MEDIANA, M2 - SEGUNDA VEIA MEDIANA, M3 - TERCEIRA VEIA MEDIANA, CUA1 - PRIMEIRA VEIA CUBITAL ANTERIOR, CUA2 - SEGUNDA VEIA CUBITAL ANTERIOR, A1 + 2 - VEIA ANAL REPRESENTANDO A PRIMEIRA VEIA E A SEGUNDA FUNDIDAS, A1 - PRIMEIRA VEIA ANAL



FONTE: O autor (2017).

### 3.1.1.2 Morfologia externa da escama androconial da veia Sc+R1

Escamas androconiais são os receptores finais da secreção de feromônio. Externamente, seguem o padrão descrito até o momento para escamas de lepidópteros heliconíneos. As escamas androconiais possuem duas paredes unidas na base e nas laterais, que formam o corpo principal ou lâmina [FIGURA 18 - a, b, c, (mb)]. No topo, são abertas e a superfície apical coberta por franjas [FIGURA 18 - a, b, c, (f)]. Na base possuem um pedicelo [FIGURA 18 - a, b, c, (p)] central. O pedicelo encaixa-se na cavidade cuticular [FIGURA 18 - a, b, c, (cs)] da veia Sc + R1 da asa. O tamanho das escamas androconiais é variável nos lepidópteros em estudo (Tabela 2). A largura é

maior em *H. erato phyllis* do que em ordem decrescente em *H. besckei* e *H. ethilla narcaea* (FIGURA 18 - d1). O comprimento é maior em *H. ethilla narcaea*, do que em ordem decrescente, em *H. besckei* e *H. erato phyllis* (FIGURA 18 - d2). A área total da escama é maior em *H. ethilla narcaea*, seguida em ordem decrescente por *H. besckei* e *H. erato phyllis* (FIGURA 18 - d3).

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA ESCAMA ANDROCONIAL (ANDROCONIUM) EM *Heliconius* spp.

No	Lepidópteros	No de espécimes	Comprimento (µm) <sup>a</sup>			Largura (µm) <sup>b</sup>			Área (µm) <sup>c</sup>		
			Média (±)	EP	EP	Média (±)	EP	Média (±)	EP	EP	
1	<i>H. erato phyllis</i>	15	76,21 (±)	1,34	0,88	34,62 (±)	0,88	24,68 (±)	0,43	0,43	
2	<i>H. ethilla narcaea</i>	15	81,83 (±)	1,05	0,97	27,41 (±)	0,97	26,17 (±)	0,38	0,38	
3	<i>H. besckei</i>	15	76,85 (±)	1,27	0,50	30,60 (±)	0,50	25,10 (±)	0,42	0,42	

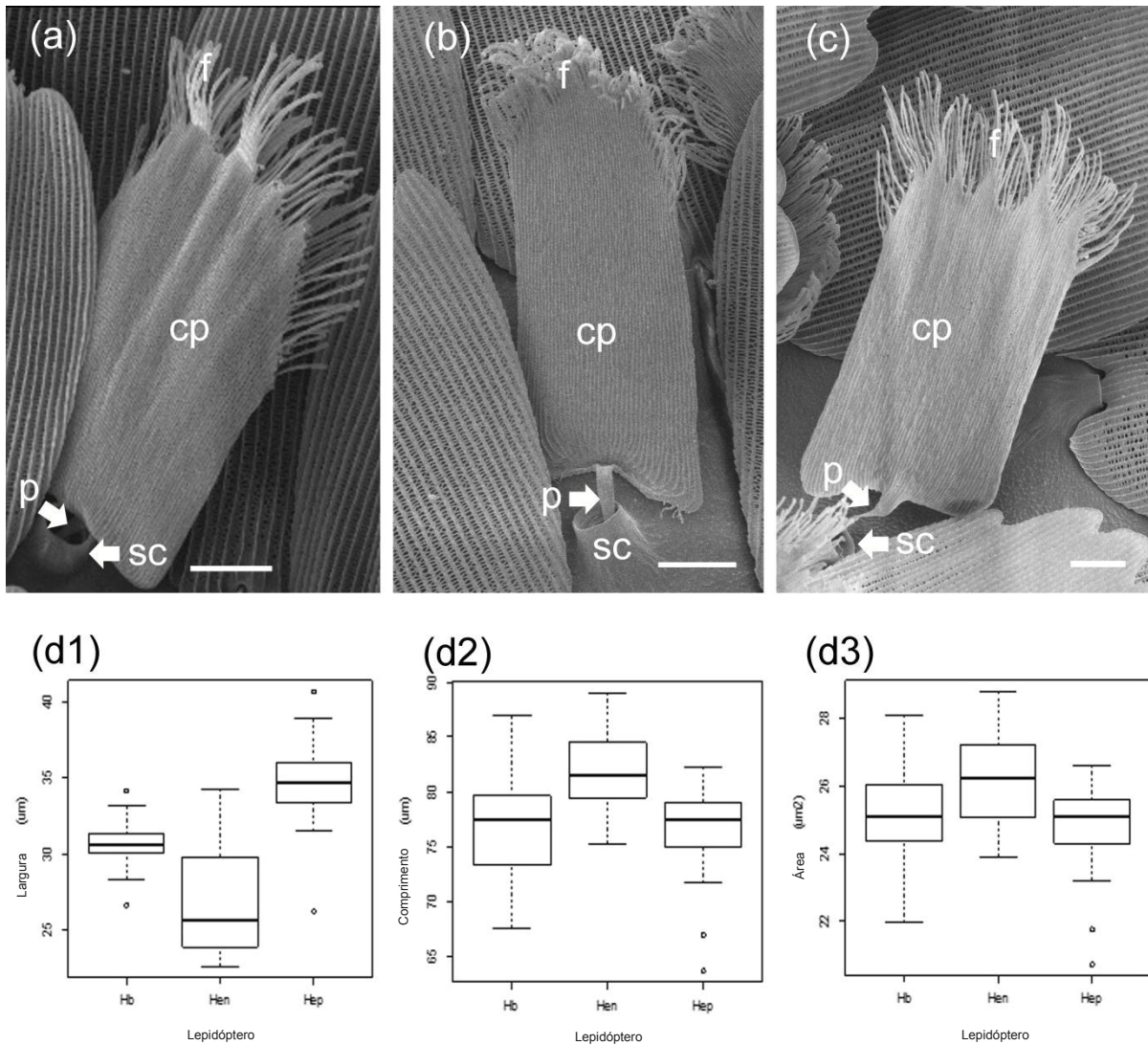
<sup>a</sup> Medida da base central até a maior extremidade das franjas

<sup>b</sup> Medida da borda direita até a borda esquerda

<sup>c</sup> Medida da área interna

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 18 - MICROGRAFIAS DE MEV DE ESCAMAS ANDROCONIAIS DA ASA POSTERIOR DO MACHO DAS SEGUINTE ESPÉCIE E SUBESPÉCIES DE *Heliconius*. (a) *Heliconius erato phyllis*. (b) *Heliconius ethilla narcaea*. (c) *Heliconius besckei*. Barras = 10  $\mu\text{m}$ . ABREVIACOES: f - FRANJAS, p - PEDICELO, sc - SOQUETE CUTICULAR, e cp - CORPO PRINCIPAL OU LÂMINA. COMPARACOES DE LARGURA, COMPRIMENTO E ÁREA DO ANDROCONIUM DAS TRÊS ESPÉCIES ESTUDADAS. GRÁFICOS MOSTRANDO A MEDIDA DAS ESCAMAS DE CHEIRO DOS TRÊS LEPIDPTEROS ESTUDADOS: (d1) LARGURA. (d2) COMPRIMENTO. (d3) ÁREA



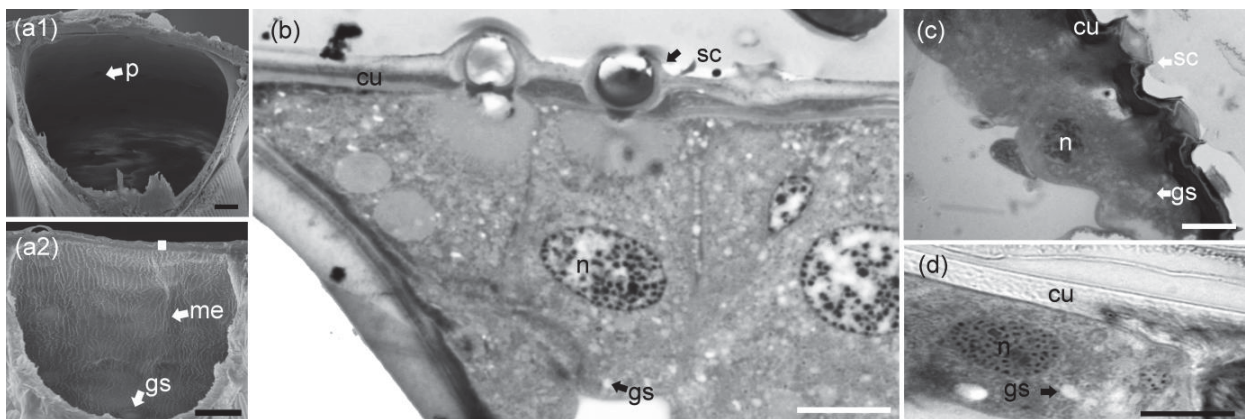
FONTE: O autor (2017).



### 3.1.1.3 Glândulas associadas

A membrana que envolve internamente a veia Sc + R1 em estudo na fêmea mostra uma aparência lisa com orifícios (FIGURA 19 - a1), enquanto no macho é translúcida e enrugada, permitindo que os grânulos de secreção apareçam em alguns casos (FIGURA 19 - a2). As glândulas associadas às escamas androcônias do macho estão localizadas na base da cutícula na região plana e superior do vaso (FIGURA 19 - a2 no quadrado branco). Através de cortes semifinos observou-se que as células glandulares apresentam um núcleo grande e numerosos grânulos de secreção (FIGURA 19 3 - b, c, d). O pedicelo da escama androconial presente na região dorsal da veia parece receber a secreção diretamente da célula glandular (FIGURA 19 - b, c, d). O pedicelo da escama de odor na célula da asa parece receber a secreção dos canais da cutícula. Do pedicelo, a secreção fluiria para o corpo principal da escama androconial. Segundo Noirot e Quenedey (1974), as glândulas associadas às escamas androconiais são do tipo I.

FIGURA 19 - IMAGENS DE MEV DO CORTE TRANSVERSAL DA VEIA Sc + R1 DO MACHO E DA FÊMEA. (a1) FÊMEA DE *Heliconius besckei*. (a2) MACHO DE *Heliconius erato phyllis*. BARRAS = 10  $\mu$ m. ABREVIÇÕES: p - PORO, me - MEMBRANA ENRUGADA e gs - GRÂNULOS DE SECREÇÃO. MICROGRAFIAS DE MET DA ÁREA CUTICULAR (a1 - QUADRADO BRANCO) DE CORTES SEMIFINOS DA VEIA Sc + R1 DO MACHO DE: (a) *Heliconius erato phyllis*. (b) *Heliconius ethilla narcaea*. c) *Heliconius besckei*. BARRAS = 40  $\mu$ m. ABREVIÇÕES: cu - CUTÍCULA, sc - SOQUETE CUTICULAR, gs - GRÂNULOS DE SECREÇÃO e n - NÚCLEO



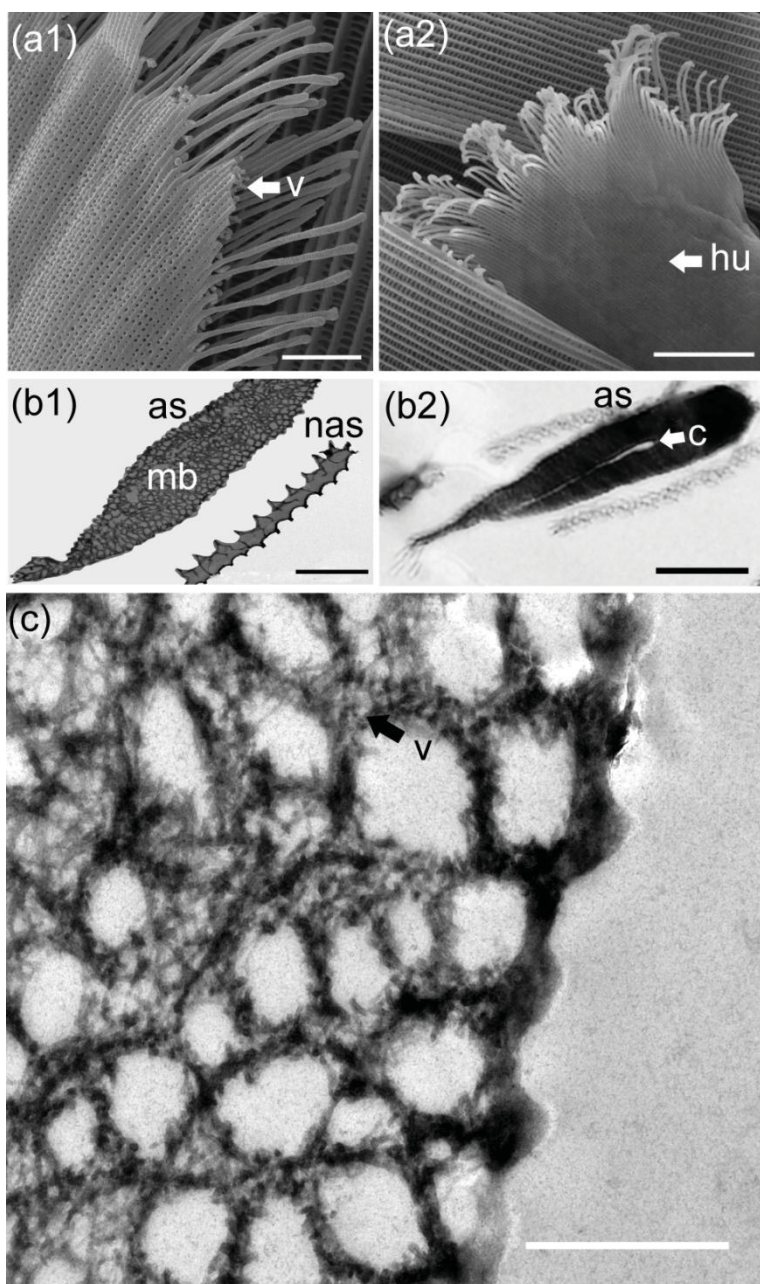
FONTE: O autor (2017).

### 3.1.1.4 Morfologia interna do Androconium

Imagens de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura mostram que dentro da escama androconial existem pequenas estruturas ou vesículas (FIGURA 20 - a1) que a tornam úmida e mais volumosa (FIGURA 20 - a2) do que escamas não androconiais. Cortes semifinos sugerem que essas vesículas são formadas por quitina porosa e ocupam o lúmen da escama (FIGURA 20- b1, c), ao redor de um canal interno (FIGURA 20 - b2) que se estende da base do pedicelo até a abertura superior do escama androconial.



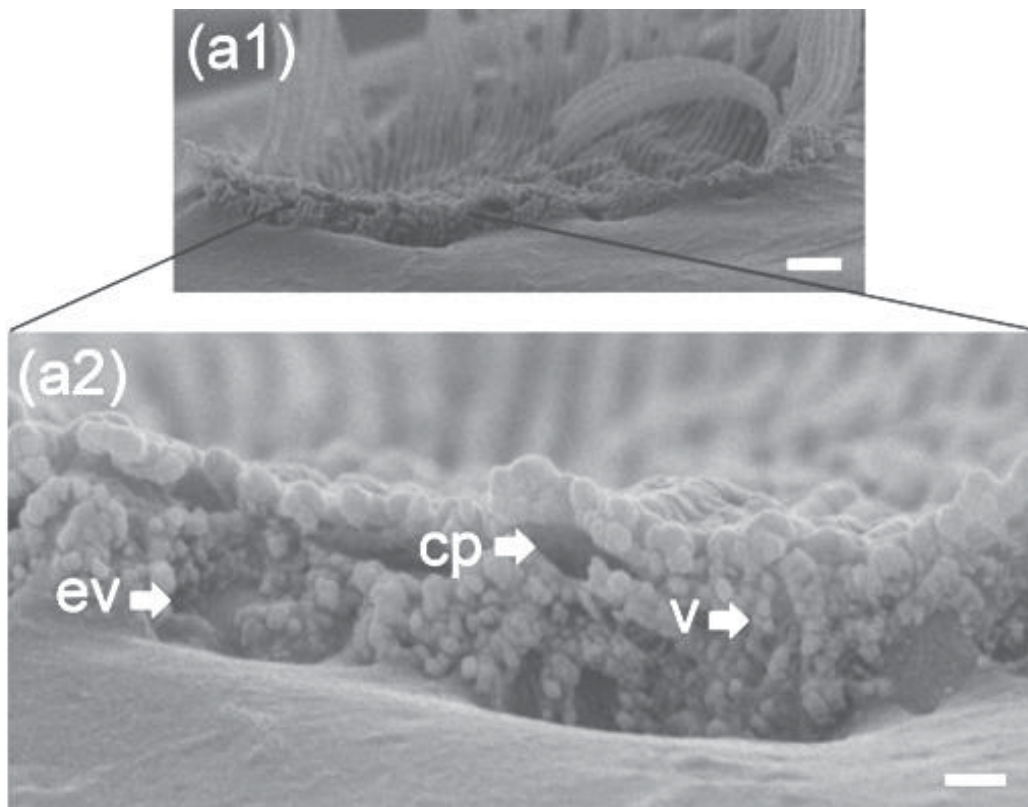
FIGURA 20 - MICROGRAFIAS DE MEV DE ESCAMAS ANDROCONIAIS DO MACHO DE *Heliconius erato phyllis*. (a1) MOSTRANDO VESÍCULAS. BARRA = 5  $\mu\text{m}$ . (a2) UMIDADE DEVIDO À PRESENÇA DE VESÍCULAS INTERNAS. BARRA = 10  $\mu\text{m}$ . ABREVIÇÕES: v - VESÍCULAS e u - UMIDADE. MICROGRAFIAS DE MET DE CORTE LONGITUDINAL ULTRA-FINO (b1) E CORTE SEMIFINO (b2) DA ESCAMA ANDROCONIAL. (b1) *Heliconius erato phyllis*. BARRA = 5  $\mu\text{m}$ . (b2) *Heliconius besckei*. BARRA = 40  $\mu\text{m}$ . c) DETALHE DAS VESÍCULAS POROSAS. BARRA = 1  $\mu\text{m}$ . ABREVIÇÕES: ea - ESCAMA ANDROCONIAL, ena - ESCAMA NÃO ANDROCONIAL, v - VESÍCULA, cp - LÚMEN DO CORPO PRINCIPAL, c - CANAL e cp - CANAL DO PORO



FONTE: O autor (2017).

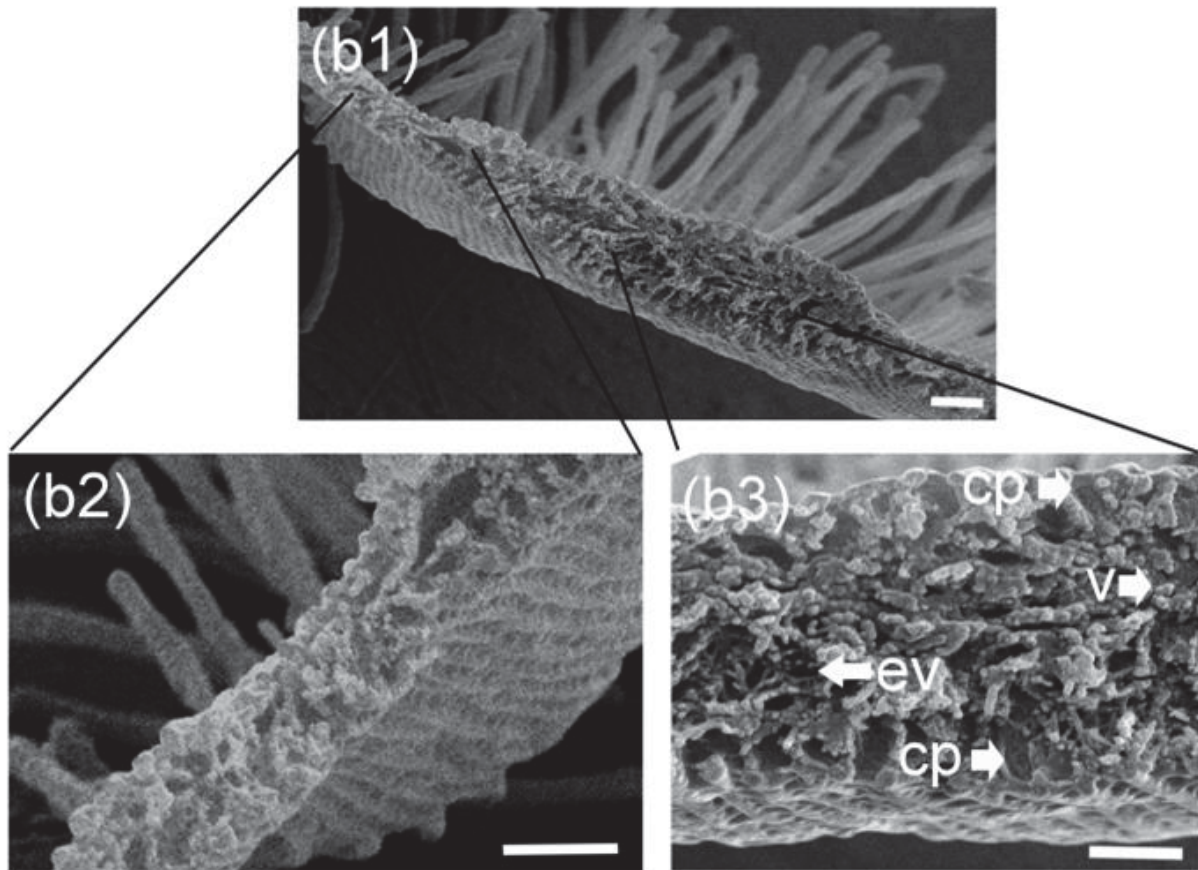
Secções frontais analisadas em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostram que as vesículas apresentam uma distribuição espacial diferenciada dentro da escama, sendo mais abundante na região central e mais escassa nas bordas (FIGURA 21 - a1, FIGURA 22 - b1, FIGURA 23 - c1). As vesículas se unem de maneira aleatória formando um labirinto de vesículas e espaços vazios (FIGURA 22 - b3). Os poros do corpo principal da escama originam canais internos (canal de poros) (FIGURA 21 - a2, FIGURA 22 - b3, FIGURA 23 - c2) que comunicam o ambiente externo com as vesículas internas. Morfologicamente, as vesículas parecem ser mais numerosas e com poucos espaços vazios em *H. besckei* (FIGURA 23 - c1). *Heliconius erato phyllis* e *H. ethilla narcaea* apresentam distribuição espacial similar das vesículas, mas menos numerosas e com mais espaços vazios (FIGURA 21 - a1, FIGURA 22 - b1).

FIGURA 21 - IMAGENS DE MEV DE CORTES FRONTAIS (SECÇÕES PARALELAS À SUPERFÍCIE PLANA) DA ESCAMA ANDROCONIAL DO MACHO. (a1, a2) *Heliconius erato phyllis*. BARRAS = 2  $\mu\text{m}$ , 0,2  $\mu\text{m}$ , RESPECTIVAMENTE. ABREVIATURAS: v -. VESÍCULAS, cp – CANAL DO PORO e ev - ESPAÇOS VAZIOS



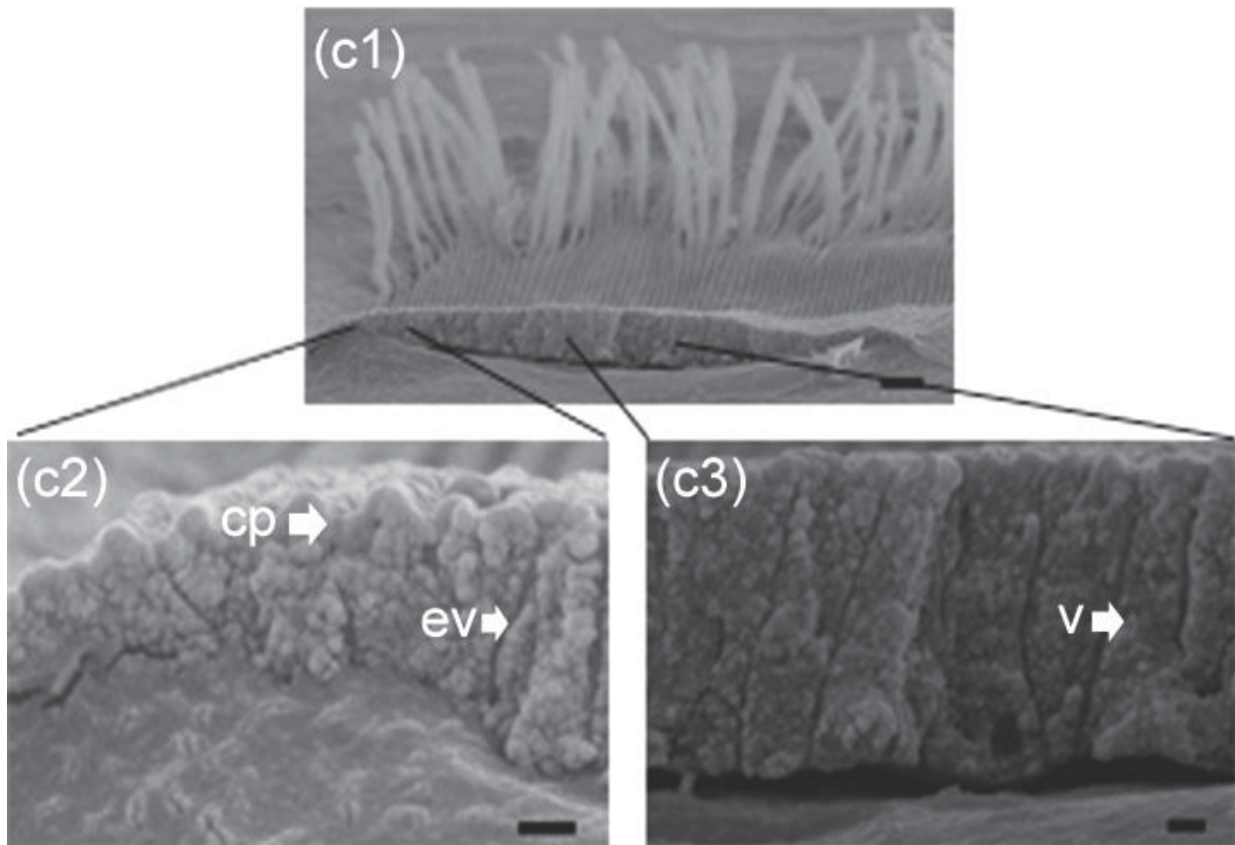
FONTE: O autor (2017).

FIGURA 22 - IMAGENS DE MEV DE CORTES FRONTAIS (SECÇÕES PARALELAS À SUPERFÍCIE PLANA) DA ESCAMA ANDROCONIAL DO MACHO. (b1, b2, b3). *Heliconius ethilla narcaea*. BARRAS = 2, 2, 1, RESPECTIVAMENTE. ABREVIATURAS: v -. VESÍCULAS, cp – CANAL DO PORO e ev - ESPAÇOS VAZIOS



FONTE: O autor (2017).

FIGURA 23 - IMAGENS DE MEV DE CORTES FRONTAIS (SECÇÕES PARALELAS À SUPERFÍCIE PLANA) DA ESCAMA ANDROCONIAL DO MACHO. (c1, c2, c3). *Heliconius besckei*. BARRAS = 2  $\mu\text{m}$ , 0,2  $\mu\text{m}$ , 0,2  $\mu\text{m}$ , RESPECTIVAMENTE. ABREVIATURAS: v - VESÍCULAS, cp - CANAL DO PORO e ev - ESPAÇOS VAZIOS



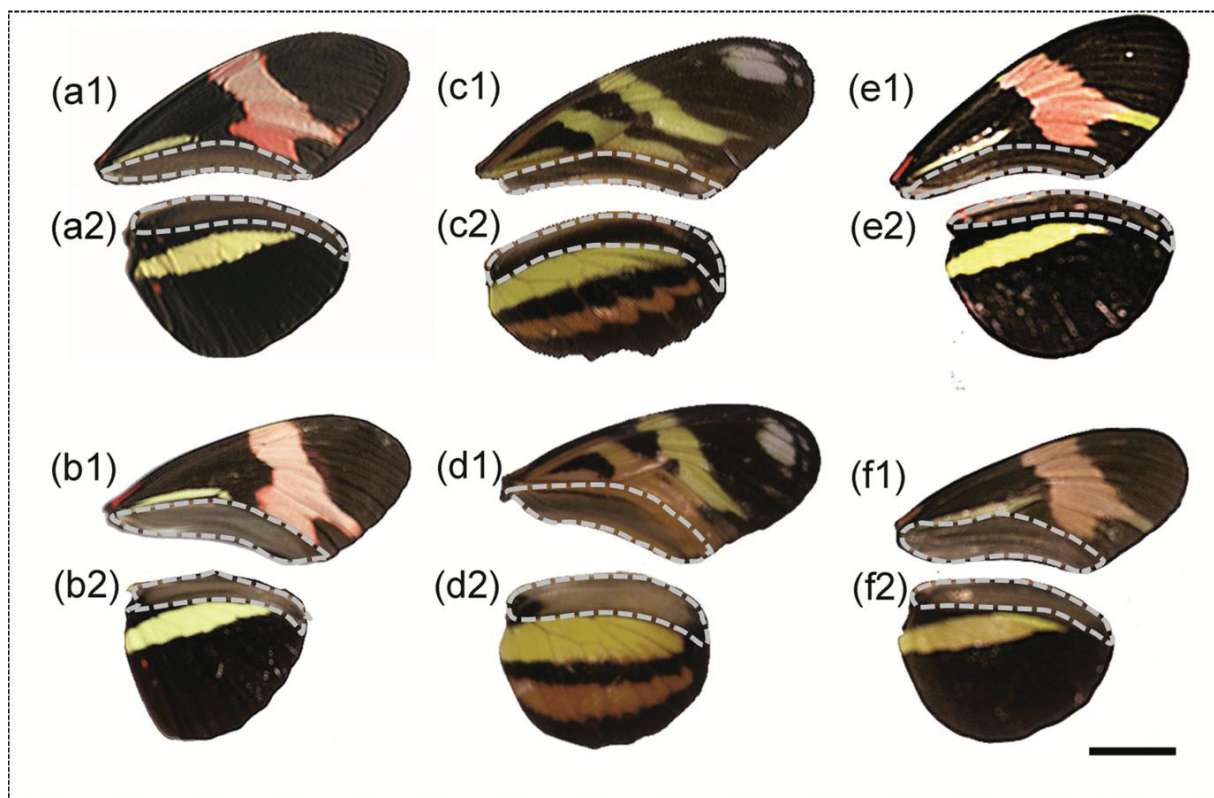
FONTE: O autor (2017).



### 3.1.1.5 Diferenciação sexual através da faixa de sobreposição

A fêmea de *H. erato phyllis* apresenta uma faixa de sobreposição mais escura (FIGURA 24 - a1, a2) que o macho, com uma cor marrom opaca, a asa posterior com uma ligeira linha amarela na borda e mais estreita que no macho. A faixa de sobreposição macho (FIGURA 24 - b1, b2) é cinza claro e brilhante. A fêmea de *H. ethilla narcaea* apresenta na faixa de sobreposição da asa anterior (FIGURA 24 - c1) uma faixa escura na área central, circundada por faixas de cor caramelo, e na asa posterior (FIGURA 24 - c2) a faixa de cor caramelo, mais estreito que no macho. No macho, a faixa de sobreposição da asa anterior (FIGURA 24 - d1) é mais clara que a da fêmea e tem uma linha mais escura na região central. A faixa de sobreposição das asas posteriores é de cor cinza caramelo brilhante (FIGURA 24 - d2). A fêmea de *H. besckei* possui uma faixa de sobreposição mais escura que a do macho, de cor marrom opaca (FIGURA 24 - e1, e2). As asas posteriores (FIGURA 24 - e2) tem uma ligeira linha rosa-avermelhada na borda superior, que é mais estreita no macho. A faixa de sobreposição do macho (FIGURA 24 - f1, f2) é cinza claro e brilhante.

FIGURA 24 - IMAGENS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DA ASA ANTERIOR E POSTERIOR DA FÊMEA (LINHA TRACEJADA), RESPECTIVAMENTE. (a1, a2) *Heliconius erato phyllis*, (c1, c2) *Heliconius ethilla narcaea*, (e1, e2) *Heliconius besckei*. IMAGENS DE FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DA ASA ANTERIOR E POSTERIOR DO MACHO (LINHA TRACEJADA), RESPECTIVAMENTE. (b1, b2) *Heliconius erato phyllis*, (d1, d2) *Heliconius ethilla narcaea*, (f1, f2) *Heliconius besckei*. Barra = 1 cm.



FONTE: O autor (2017).

### 3.1.2 Análises Químicas

#### 3.1.2.1 Análise qualitativa inicial

As análises em CG-EM da faixa de sobreposição, onde estão as escamas androconiais de cada lepidóptero estudado (FIGURA 25), mostraram que asas anteriores e posteriores dos machos possuem os mesmos compostos, com diferença nas quantidades dos mesmos. *Heliconius erato phyllis* possui dez (10) compostos, *Heliconius ethilla narcaea* possui nove (9) compostos e *Heliconius besckei*, cinco (5) compostos (FIGURA 26). Todos os compostos encontrados na faixa de sobreposição das asas de *H. besckei* estão presentes no *bouquet* odorífero da androcônia de *H. ethilla narcaea*.

A faixa de sobreposição das asas posteriores possui maior quantidade dos compostos em todos os lepidópteros, pois nesta se encontra maior quantidade de escamas androconiais. Em *Heliconius erato phyllis* a quantidade geral de compostos é equivalente no macho excitado e não excitado. Em análise de *Heliconius ethilla narcaea* e análises parciais de *Heliconius besckei*, o macho não excitado possui maior quantidade geral dos compostos.

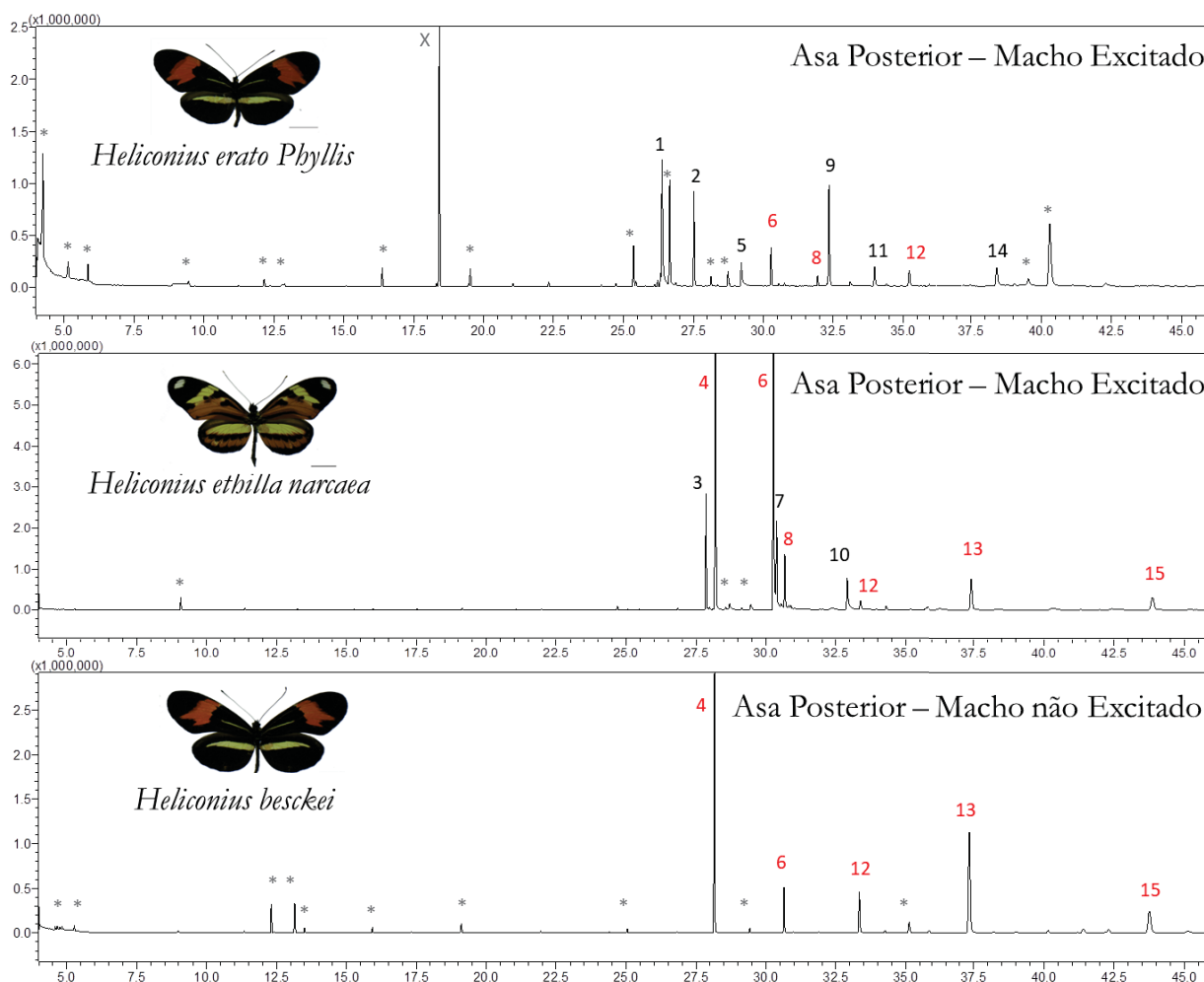
Identificação estrutural básica dos bouquets odoríferos.

FIGURA 25 - IMAGEM DE MO DE ESCAMA NÃO ANDROCONIAL (SEM CONTEÚDO ESCURO) E ESCAMA ANDROCONIAL (COM CONTEÚDO ESCURO) DE *Heliconius erato phyllis* (a), *Heliconius ethilla narcaea* (b) e *Heliconius besckei* (c).



FONTE: O autor (2017).

FIGURA 26 - COMPARAÇÃO ENTRE CROMATOGRAMAS DE EXTRATOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS POSTERIORES DE MACHOS EXCITADOS DE *Heliconius erato phyllis*, *Heliconius ethilla narcaea* E DE MACHO NÃO EXCITADO DE *Heliconius besckei*. OS NÚMEROS EM VERMELHO CORRESPONDEM AOS COMPOSTOS QUE SÃO COMUNS ENTRE OS LEPIDÓPTEROS. (X), PADRÃO INTERNO (TETRADECANO, 100ppm A 5 $\mu$ L/EXTRATO). (\*), ARTEFATOS DA TÉCNICA.



FONTE: O autor (2017).

### 3.1.2.2 Análise qualitativa pelo índice de retenção (Kovats)

Os compostos foram identificados nos bouquets das androcônias das asas dos lepidópteros (TABELA 3) mostram a presença das funções ácido, álcool, hidrocarboneto, éster e aldeído. Dentre os compostos o tricosano (6) e o pentacontano (12) são encontrados na faixa de sobreposição dos três lepidópteros. *Heliconius erato phyllis* e *H. ethilla narcaea* possuem o composto (11Z)-icos-11-enol (8) em comum. Já *H. ethilla narcaea* e *H. besckei* possuem os compostos eneicosano (4), heptacosano (13) e esqualeno (15), em comum



TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE OS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NA ANDROCÔNIA ALAR DE *Heliconius erato phyllis*, *Heliconius ethilla narcaea* E *Heliconius besckei*

	Tempo de Retenção	IR calc	Composto	IR lit	<i>Heliconius erato phyllis</i>	<i>Heliconius ethilla narcaea</i>	<i>Heliconius besckei</i>
1	26,387	1867	hexadecanol	1868			
2	27,525	1965	ácido hexadecanóico	1968			
3	29,029	2077	(9Z)-heneicos-9-ano	2071			
4	29,355	2101	heneicosano	2100			
5	30,271	2172	estereato de etila	2177			
6	31,932	2297	tricosano	2300			
7	31,598	2269	(9Z)-tricos-9-eno	2270			
8	31,011	2267	(11Z)-icos-11-enol	2262			
9	32,341	2333	11-metil-tricosano	2334			
10	34,650	2462	(13Z)-docos-13-enol	2466			
11	33,963	2400	(13Z)-docos-13-enal	2401			
12	35,208	2500	pentacontano	2500			
13	40,254	2700	heptacosano	2700			
14	38,392	2633	tetracosanal	2632			
15	44,450	2810	esqualeno	2808			

Compostos identificados no bouquet da Androcônia Alar de *Heliconius erato phyllis*, *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei*.

FONTE: Me. Douglas José de Melo e o autor (2018).

### 3.1.2.2.1 Importância biológica

Os compostos identificados foram abaixo separados de acordo com a sua ocorrência como feromônio, alomônios, atrativo, cairomônios e sinomônios em animais [vertebrados (V) e invertebrados (I)] e plantas, de acordo com a base de dados de feromônios El-Sayed (2018).

1. Hexadecanol: (I) Feromônio na glândula de veneno e alomônio em Formicidae. (V) Não foram encontrados registros.

2. Ácido hexadecanóico: (I) Aracnídeos: Feromônio e atrativo, Insetos: Feromônio em Trichoptera, Heteroptera, Acaridae, atrativo em Dytioptera, feromônio, atrativo e cairomônio em Hymenoptera, Amblyommidae. (V) Répteis, Anfíbios, Mamíferos, Aves: Feromônio.
3. (9Z)-heneicos-9-ano: (I) Feromônio em Diptera; feromônio e atrativo em Lepidoptera. (V) Não foram encontrados registros.
4. Eneicosano: (I) Arachnida: Feromônio, Insecta: Feromônio em Trichoptera, Dictyoptera, Homoptera, Psocoptera, Heteroptera, Orthoptera, Lepidoptera [famílias Tortricidae, Pieridae, Nymphalidae (gêneros *Heliconius* spp.), Lymantriidae, Hesperiiidae, Danaidae, Castniidae], Isoptera; feromônio e atrativo em Hymenoptera, Diptera, Coleoptera, (V) Répteis: Feromônio, Aves: Alomônio
5. Estereato de etila: (I) Arachnida: Feromônio, Insecta: Feromônio em Hymenoptera, Lepidoptera (Nymphalidae, gêneros *Bicyclus* sp., *Heliconius* sp.), feromônio e atrativo em Coleoptera, (V) Anfíbios: Feromônio.
6. Tricosano: (I) Arachnida: Feromônio, Insecta: Feromônio em Trichoptera, Dictyoptera, Orthoptera, Psocoptera, Homoptera, Heteroptera, Orthoptera, Lepidoptera (famílias Pyralidae, Tortricidae, Pieridae, Papilionidae, Nymphalidae (gêneros *Heliconius* spp.), Lymantriidae, Danaidae, Castniidae; feromônio e alomônio em Isoptera; feromônio, atrativo, e cairomônio em Hymenoptera, e Diptera; feromônio, atrativo e alomônio em Coleoptera, (V) Répteis: Feromônio, Aves: Alomônio.
7. (9Z)-tricos-9-eno: (I) Arachnida: Feromônio, Insecta: Feromônio em Lepidoptera [família Nymphalidae (gênero *Heliconius*), Danaidae], Heteroptera, Dictyoptera, feromônio e atrativo em Diptera, Hymenoptera; atrativo e alomônio em Coleoptera. (V) Aves: Alomônio. E em plantas: Família Orchidaceae.
8. (11Z)-icos-11-enol: (I) Insecta: Feromônio em Lepidoptera (gênero *Heliconius* spp.). (V) Não foram encontrados registros.
9. 11-metil-tricosano: (I) Insecta: Feromônio em Phasmida, Coleoptera e Lepidoptera (família Gelechiidae, gênero *Anarsia* spp.).
10. (13Z)-docos-13-enol: (I) Feromônio em Collembola.
11. (13Z)-docos-13-enal: (I) Insecta: Feromônio em Lepidoptera (família Nymphalidae, gênero *Heliconius* spp.).

12. Pentacontano: Não foram encontrados registros.
13. Heptacosano: (I) Arachnida: Feromônio, Insecta: Feromônio em Trichoptera, Astigmata, Dictyoptera, Psocoptera, Diptera, Homóptera, Heteroptera, Orthoptera, Lepidoptera (família Pieridae, Lymantriidae, Papilionidae, Lycaenidae, Danaidae, Castniidae), Isoptera; feromônio e atrativo em Hymenoptera, Coleoptera; feromônio e alomônio em Isoptera, (V) Répteis, Anfíbios: Feromônio
14. Tetracosanal: (I) Feromônio em Hymenoptera, Coleoptera e Homóptera. (V)
15. Esqualeno: (I) Arachnida: Feromônio, atrativo e alomônio, Insecta: Feromônio em Coleoptera, Neuroptera, Lepidoptera (família Pieridae, Papilionidae), Hymenoptera, Diptera; Atrativo em Neurótica. (V) Répteis, Mamíferos: Feromônio.

### 3.1.2.3 Análise quantitativa dos compostos nas androcônias de machos excitados e não excitados.

Comparando-se a faixa de sobreposição das asas posteriores e anteriores dos machos dos lepidópteros com o número de escamas androconiais e resultados das quantificações, observa-se que a faixa de sobreposição das asas posteriores, que possui maior quantidade de escamas androconiais, também possui maior quantidade geral de compostos. E, que a faixa de sobreposição das asas anteriores, devido à pequena quantidade de escamas androconiais, possui menor quantidade geral de compostos. Não se descarta aqui a transferência por contato dos voláteis de uma asa com a outra, pois as áreas de sobreposição das asas se tocam quando o animal se encontra em repouso.

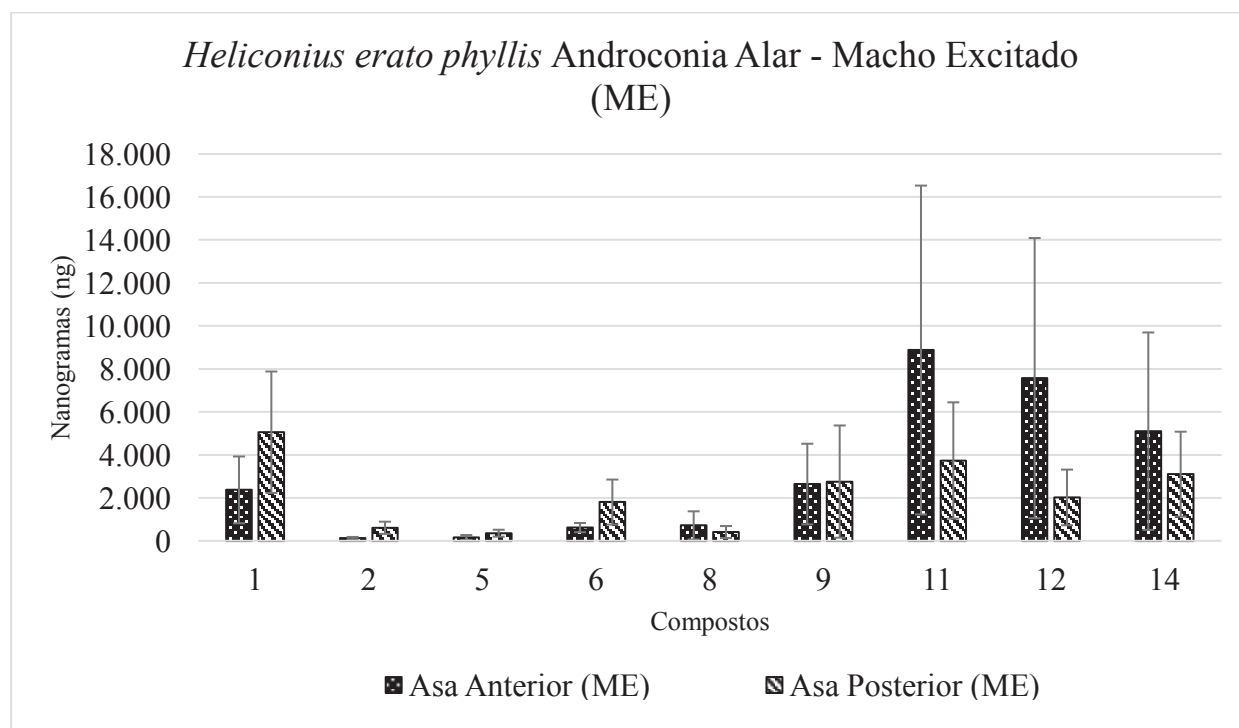
A forma da escama pode favorecer o armazenamento ou a liberação dos voláteis que podem ocorrer naturalmente devido ao calor e movimento. No macho excitado, ocorre um intenso movimento vibratório intencional, que objetiva possivelmente a liberação dos voláteis, antes da coleta das amostras para a obtenção dos extratos. No macho não excitado não existe este intenso movimento vibratório intencional e o macho aproxima-se de um possível estado de repouso.

Assim, após a comparação entre as medidas da escama androconial e as quantificações dos voláteis, em machos excitados e não excitados, observou-se que a escama androconial de *Heliconius erato phyllis* (possui menor comprimento e maior

largura, favorecendo a liberação dos voláteis). Assim, a quantidade geral de compostos é equivalente no macho excitado e não excitado (FIGURAS 27, 28 e 29), que os liberariam mais facilmente pelo calor e movimentos das asas durante o voo.

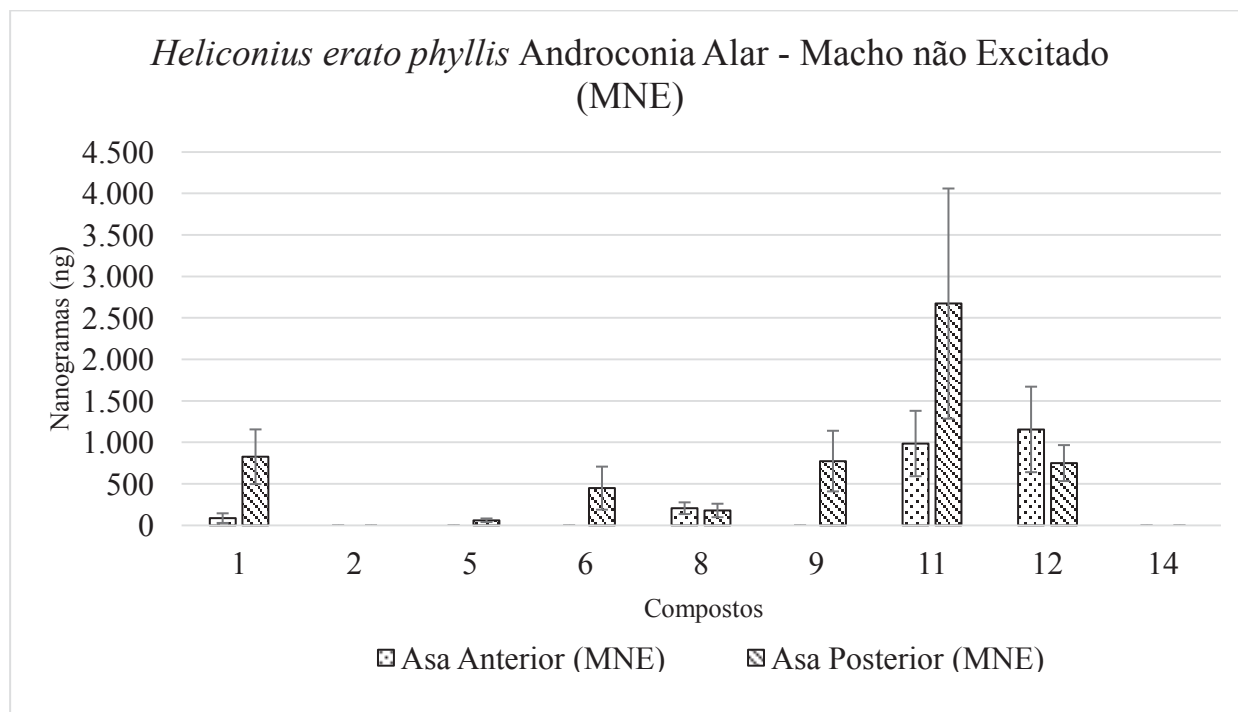
Já as escamas androconiais de *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei* possuem maior comprimento e menor largura, favorecendo o armazenamento dos voláteis. Assim no macho excitado existe menor quantidade geral dos compostos do que no macho não excitado (FIGURAS 30, 31, 32, 33, 34 e 35), que os armazenariam mais eficientemente dificultando a liberação pelo calor e movimentos das asas durante o voo.

FIGURA 27 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS EXCITADOS de *Heliconius erato phyllis*



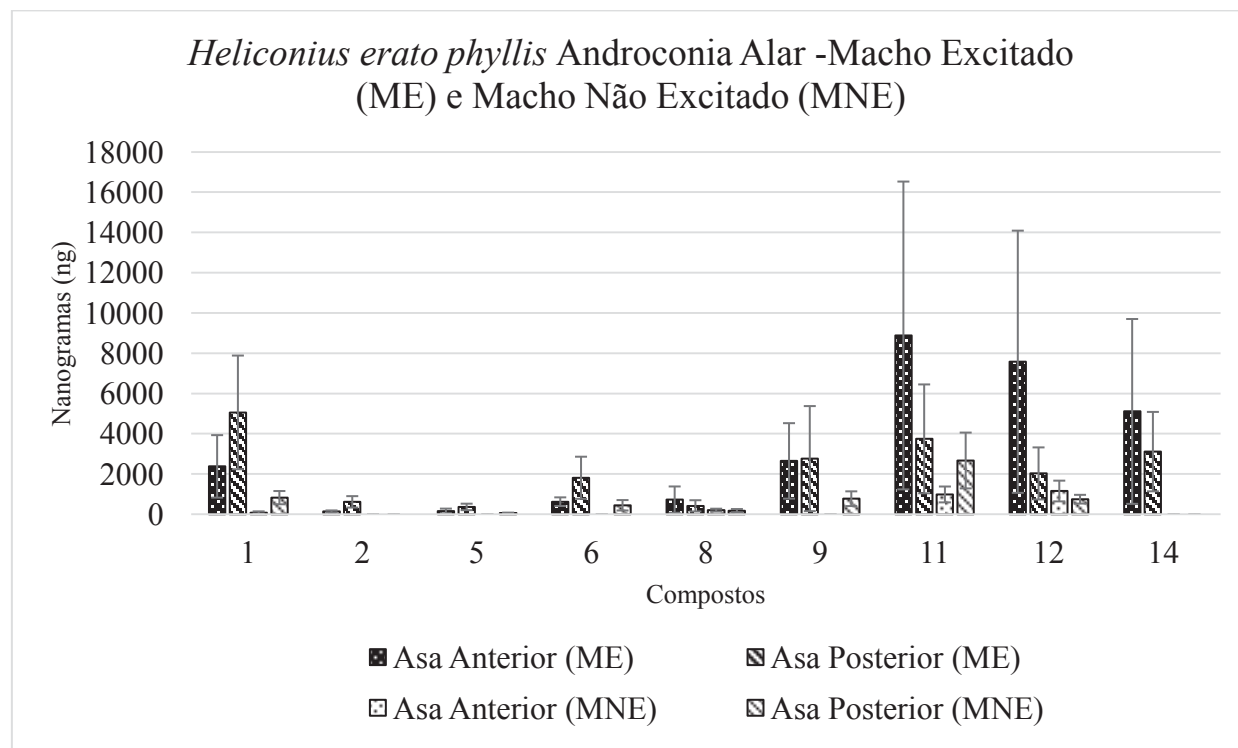
FONTE: O autor (2017).

FIGURA 28 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS NÃO EXCITADOS de *Heliconius erato phyllis*



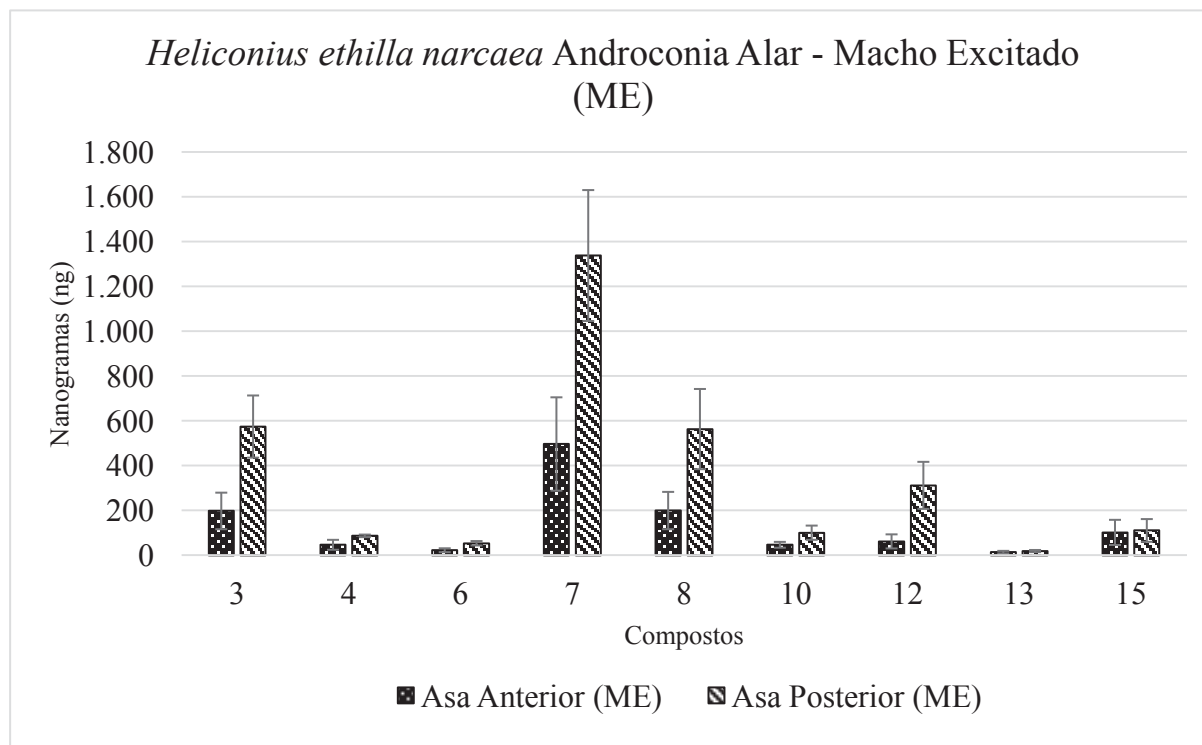
FONTE: O autor (2017).

FIGURA 29 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS EXCITADOS E NÃO EXCITADOS de *Heliconius erato phyllis*



FONTE: O autor (2017).

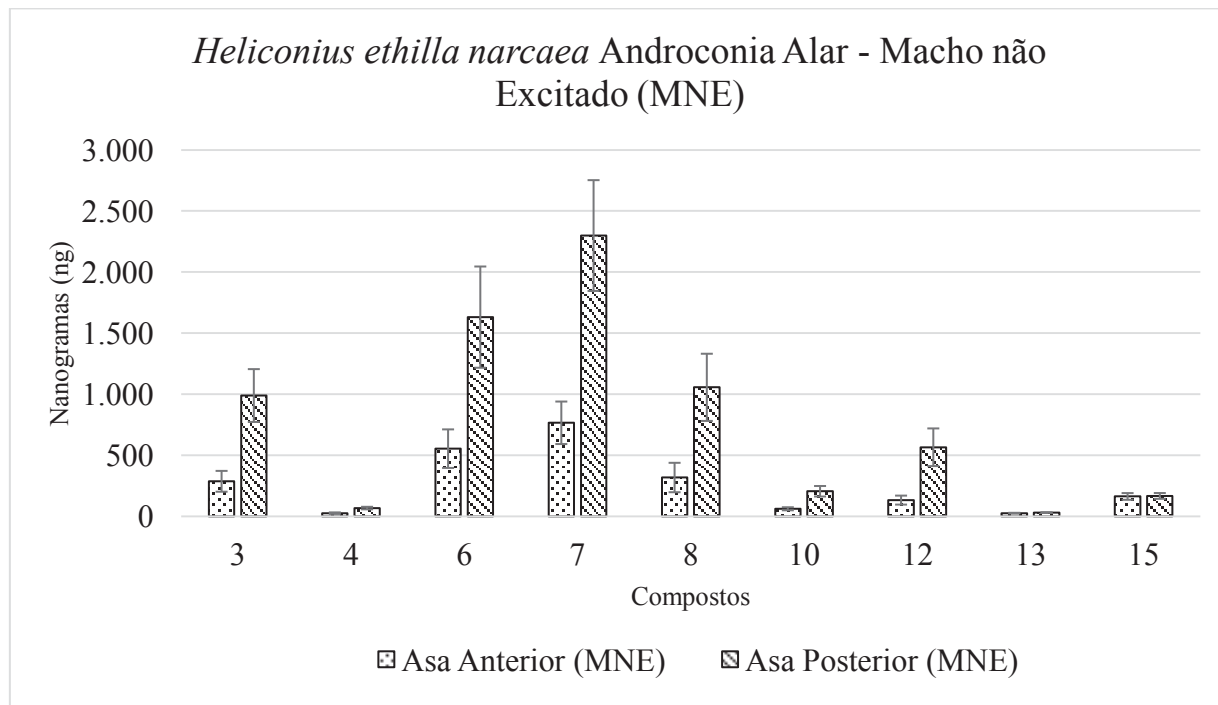
FIGURA 30 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS EXCITADOS DE *Heliconius ethilla narcaea*



FONTE: O autor (2018).

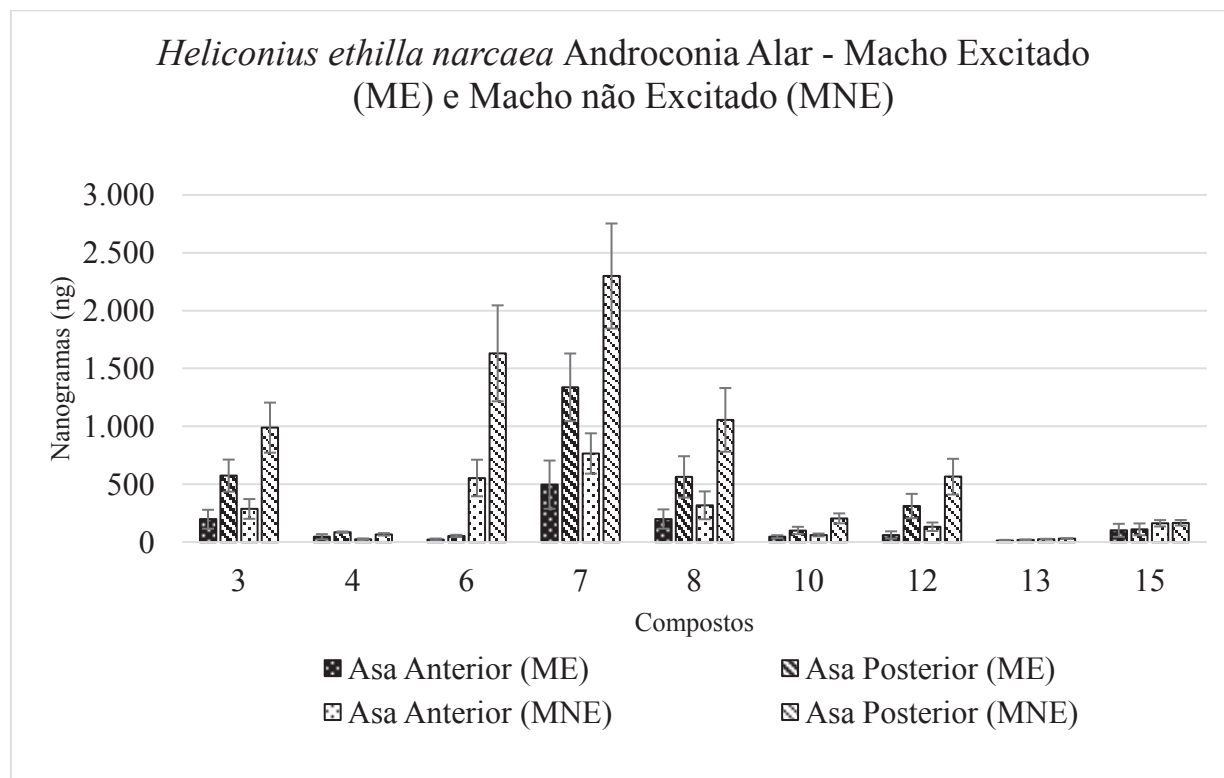


FIGURA 31 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS NÃO EXCITADOS DE *Heliconius ethilla narcaea*



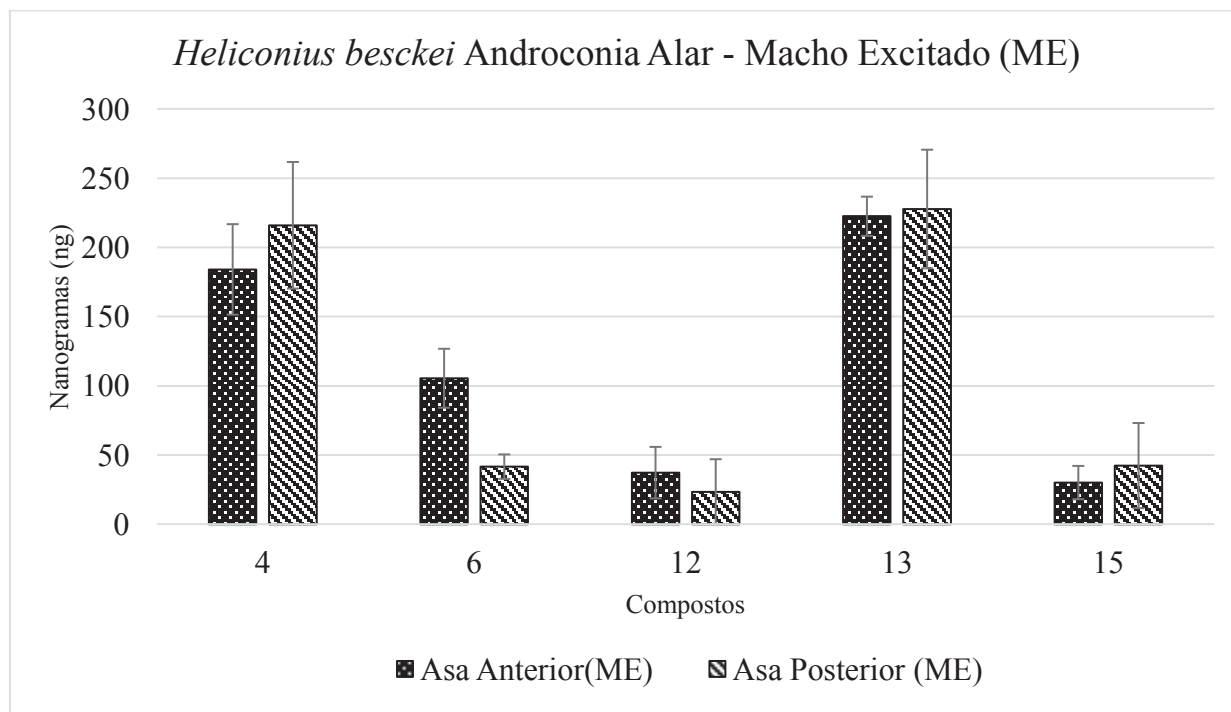
FONTE: O autor (2018).

FIGURA 32 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS EXCITADOS E NÃO EXCITADOS de *Heliconius ethilla narcaea*



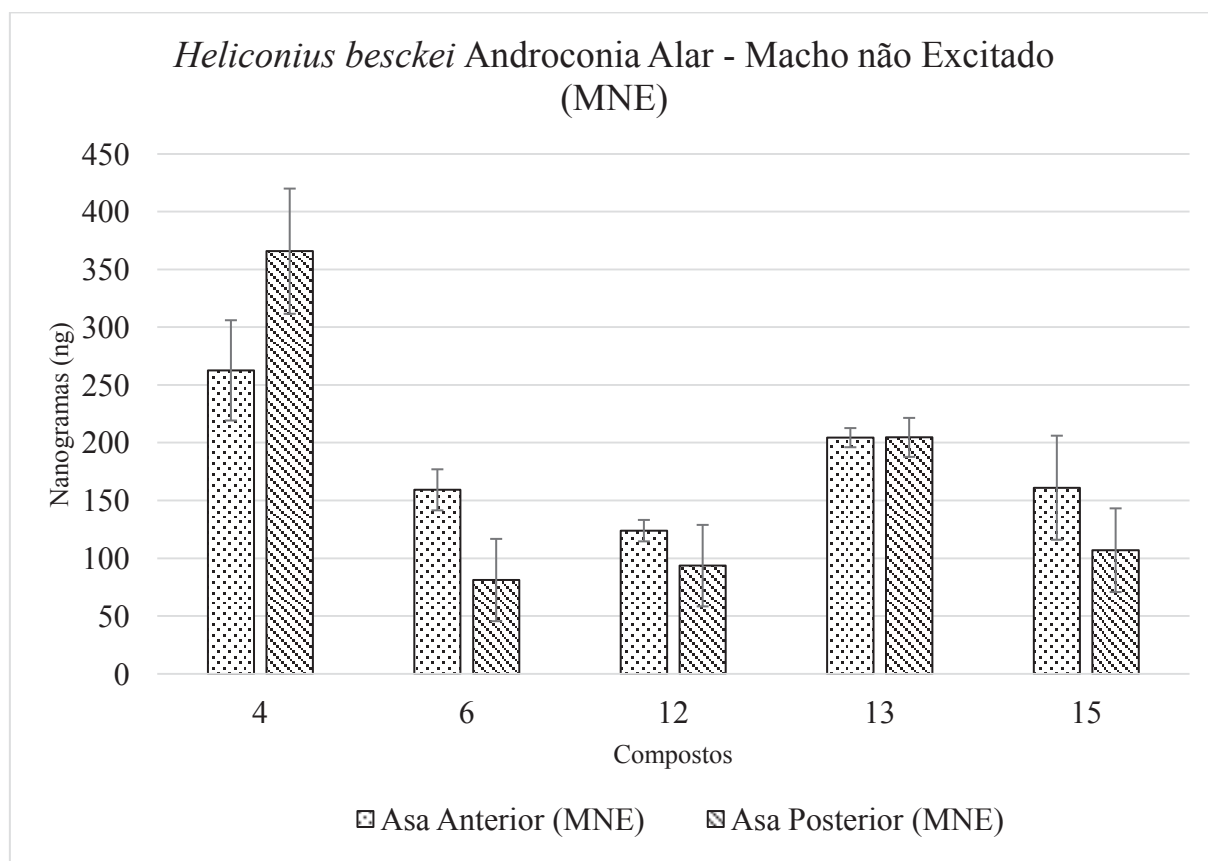
FONTE: O autor (2018).

FIGURA 33 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS EXCITADOS (ANÁLISE PARCIAL) DE *Heliconius besckei*



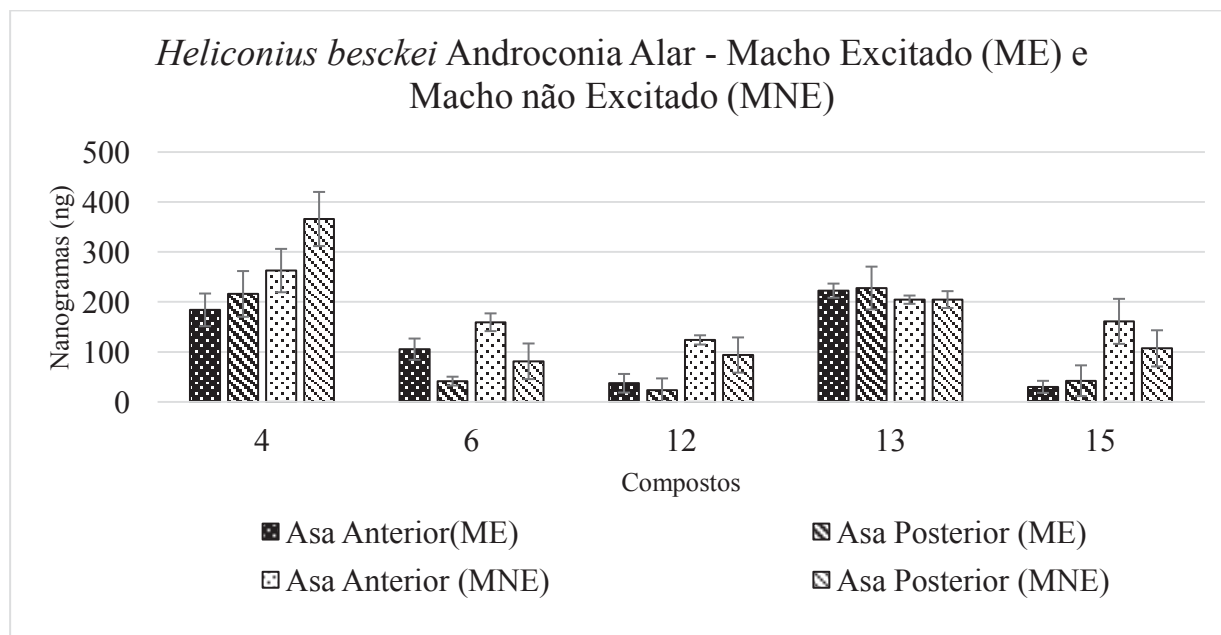
FONTE: O autor (2018).

FIGURA 34 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS NÃO EXCITADOS DE *Heliconius besckei*



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 35 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FAIXA DE SOBREPOSIÇÃO DAS ASAS ANTERIORES DE POSTERIORES DE MACHOS EXCITADOS E NÃO EXCITADOS DE *Heliconius besckei*



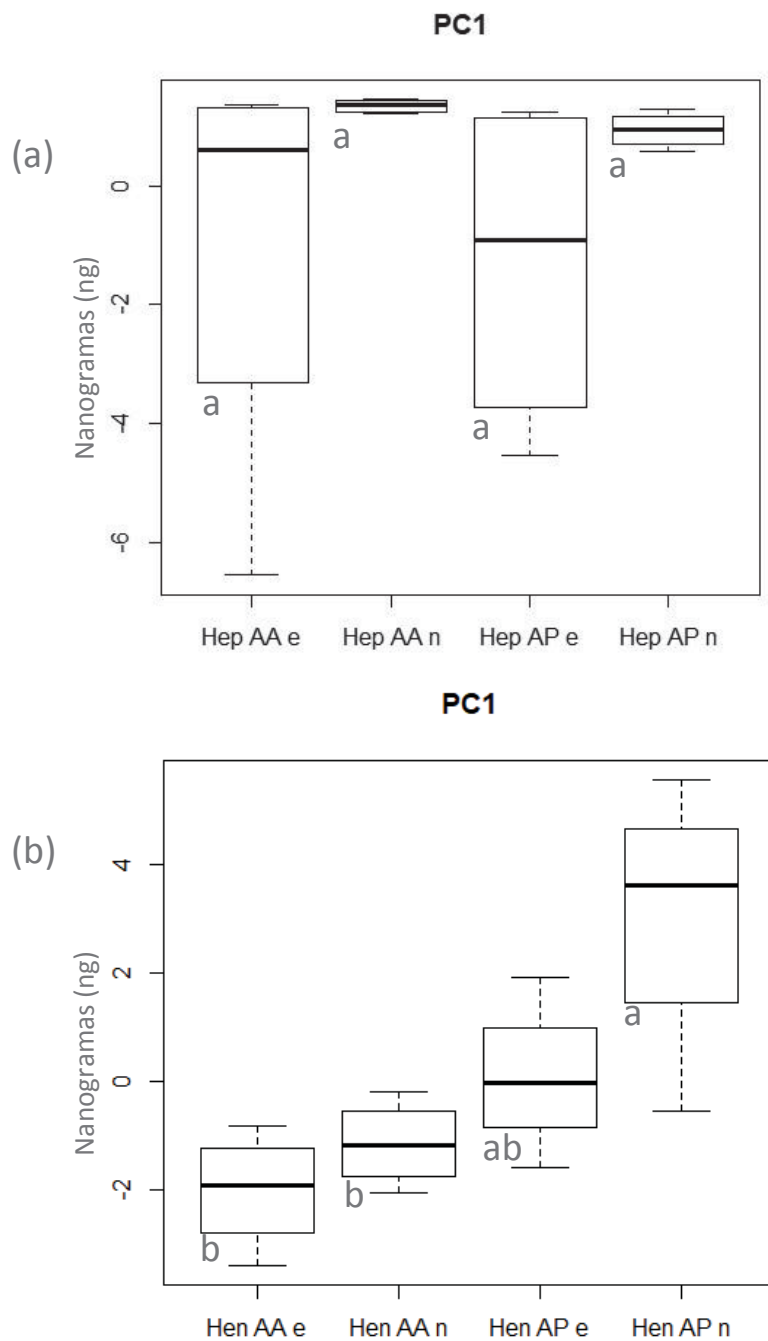
FONTE: O autor (2018).

### 3.1.2.4 Análises estatísticas

Em *H. erato phyllis* as análises estatísticas entre asas anteriores e posteriores de machos excitados e não excitados indicaram que o primeiro maior componente (PC1) da PCA (explicou 66,09% da variação) apresentou ANOVA não significativa (Traço Pillai = 0.140, F 6 = 1,8074, P = 0.3322). Os testes de Tukey não mostraram a distinção entre as quatro categorias: Macho excitado, asa anterior (AA e) e asa posterior (AP e), e macho não excitado, asa anterior (AA n) e asa posterior (AP n). Conclui-se que a quantidade de compostos não é significativamente diferente em cada uma das categorias analisadas (FIGURA 36a).

Em *H. ethilla narcaea* as análises estatísticas indicaram que o primeiro maior componente (PC1) da PCA (explicou 99,94% da variação) apresentou ANOVA significativa (Traço Pillai = 0.00848, F 6 = 3.7918, P = 0.004415 \*\*). Os testes de Tukey mostraram a distinção entre as categorias: Macho excitado, asa anterior (AA e) e asa posterior (AP e), e macho não excitado, asa anterior (AA n) e asa posterior (AP n). Conclui-se que a quantidade de compostos é significativamente diferente entre as categorias analisadas (FIGURA 36b).

FIGURA 36 - GRÁFICOS DAS ANÁLISES DE PCA DAS QUANTIFICAÇÕES DOS COMPOSTOS DA ANDROCÔNIA DA ASA ANTERIOR E DA ASA POSTERIOR DO MACHO EXCITADO E NÃO EXCITADO DE *Heliconius erato phyllis* (a) E *Heliconius ethilla narcaea* (b)



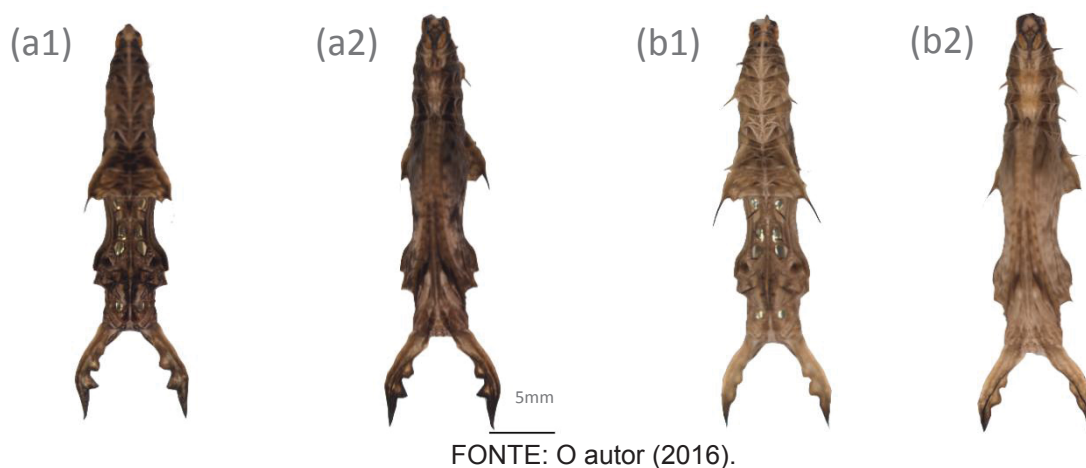
FONTE: O autor (2018).

## 3.2 ACASALAMENTO PUPAL E GUARDA PRÉ-ACASALAMENTO

### 3.2.1 As pupas

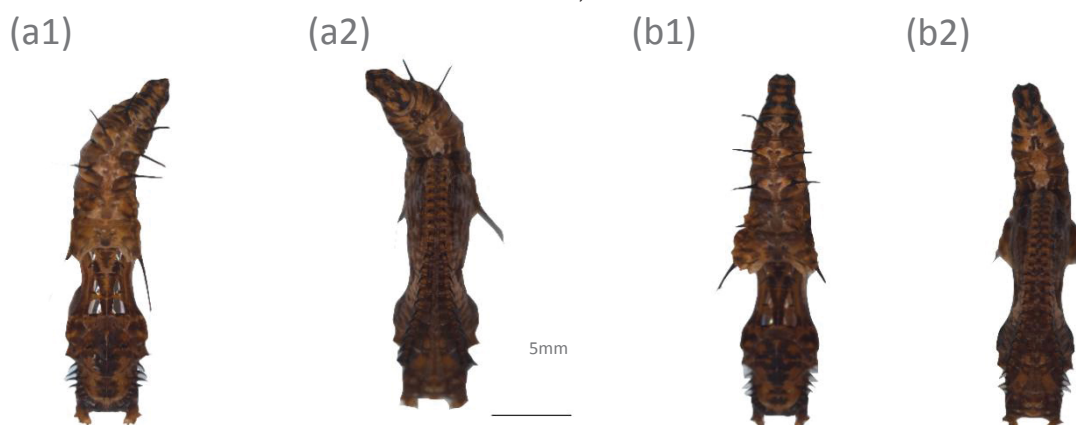
Pupas de *H. erato phyllis* e *H. ethilla narcaea* foram analisadas com relação aos possíveis voláteis emitidos, que sinalizariam para machos sobre a emergência de fêmeas e assim permitir a guarda pupal pelos machos e a cópula pupal. As pupas foram sexadas e analisadas de acordo com as suas características morfológicas (FIGURAS 37 e 38).

FIGURA 37 - PUPAS DE MACHO (a1, a2) E FÊMEA (b1, b2) DE *Heliconius erato phyllis* EM VISTAS DORSAL E VENTRAL, RESPECTIVAMENTE



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 38 - PUPAS DE MACHO (a1, b1) E FÊMEA (b1, b2) DE *Heliconius ethilla narcaea* EM VISTAS DORSAL E VENTRAL, RESPECTIVAMENTE



FONTE: O autor (2016).

### 3.2.2 Identificação de pupas macho e fêmea

Observou-se que a pupa macho em ambos os lepidópteros é identificada pela pequena abertura em forma de fenda longitudinal existente na porção final da região dorsal da pupa; já a pupa fêmea possui uma fenda maior (FIGURAS 39 e 40).

FIGURA 39 - IMAGENS DA PORÇÃO FINAL DA PUPA COM IDENTIFICAÇÃO DA PUPA FÊMEA E PUPA MACHO DE *Heliconius erato phyllis*, ATRAVÉS DA PRESENÇA DE SULCO (ASTERISCO)



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 40 - IMAGENS DA PORÇÃO FINAL DA PUPA COM IDENTIFICAÇÃO DA PUPA FÊMEA E PUPA MACHO DE *Heliconius ethilla narcaea*, ATRAVÉS DA PRESENÇA DE SULCO (ASTERISCO)



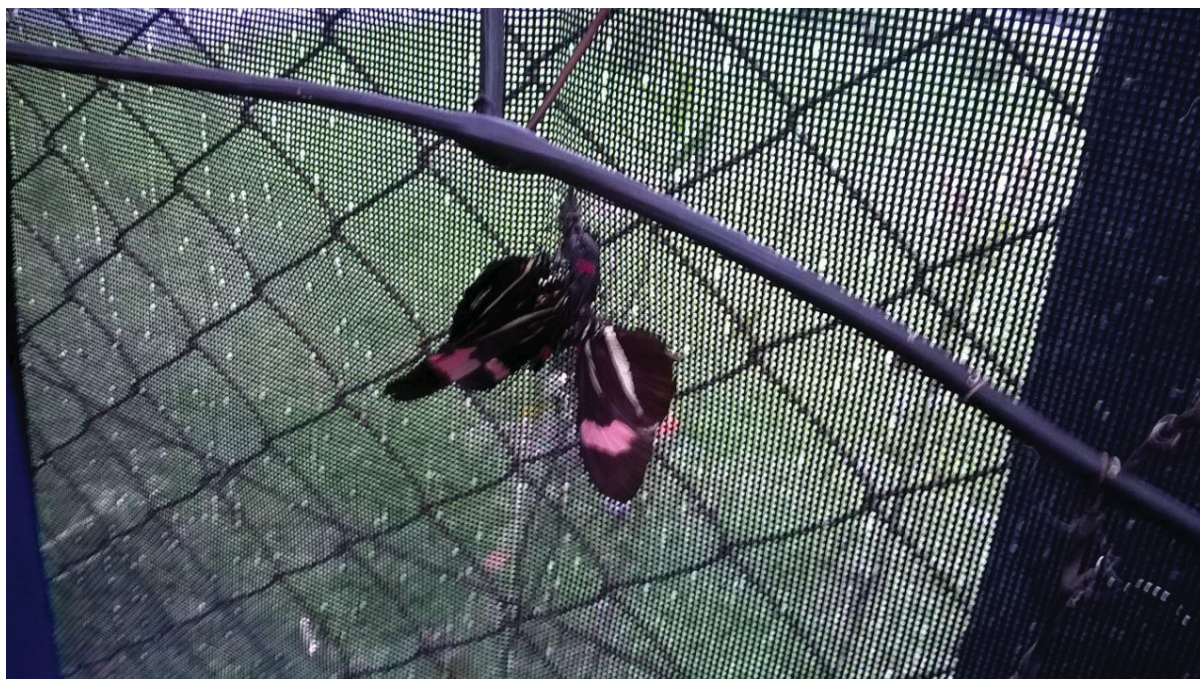
FONTE: O autor (2016).

### 3.2.3 O comportamento dos machos de ficar de guarda sobre pupas fêmeas

Foi verificado que em *Heliconius erato phyllis* ocorre a guarda pupal com pouso sobre a pupa fêmea (FIGURA 41) nas 24h anteriores à emergência.



FIGURA 41 - QUATRO MACHOS DE *Heliconius erato phyllis* REALIZAM A GUARDA PUPAL POUSADOS SOBRE A PUPA FÊMEA

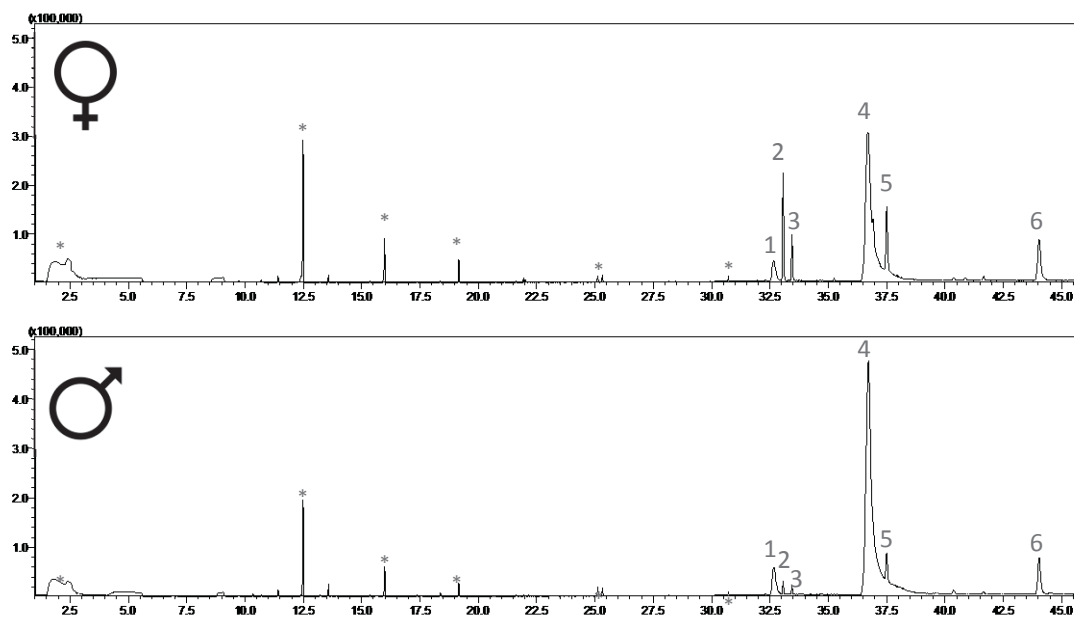


FONTE: O autor (2016).

#### 3.2.4 Voláteis encontrados na pupa macho e fêmea de *Heliconius erato phyllis*

Somente três amostras de macho e fêmea foram analisadas e os resultados parciais obtidos são colocados aqui (FIGURA 42). Nestes cromatogramas observa-se uma diferença nas concentrações de seis compostos possivelmente bioativos.

FIGURA 42 - CROMATOGRAMAS DOS VOLÁTEIS OBTIDOS DAS PUPAS FÊMEA E MACHO DE *Heliconius erato phyllis*. (\*), POSSÍVEIS ARTEFATOS DA TÉCNICA



FONTE: O autor (2016).

#### 4 DISCUSSÃO

Pela primeira vez, a análise morfológica das escamas androconiais dos lepidópteros está relacionada à sua função semioquímica. Análises dos semioquímicos nas escamas androconiais apontam para uma relação entre a quantidade de compostos armazenados e a forma das escamas. Existe uma semelhança entre a morfologia de todas as estruturas da unidade de produção de odores (célula glandular, cavidade cuticular e escama androconial) da androcônia presente nas veias Sc + R1 dos Lepidoptera em questão.

A estrutura da célula glandular do macho *Heliconius erato phyllis* mostra semelhanças com as de *Caligo eurilochus* (BARTH, 1953), com uma estrutura interna divergente. O citoplasma provavelmente apresenta dois tipos diferentes de grânulos. O primeiro tem uma estrutura globular e é encontrado em todo o citoplasma da célula glandular. O segundo tipo de grânulo é grande com separação da secreção em pequenos grânulos.

O soquete cuticular da escama androconial é maior que a cavidade cuticular das escamas não androconiais. A cavidade cuticular da veia Sc + R1 nas escamas androconiais parece estar diretamente ligada à célula glandular, ao contrário das escamas não androconiais, que parecem ter uma barreira de quitina que as impede de entrar em contato com a secreção glandular, seja diretamente da célula glandular ou dos canais da parede da quitina nas células da asa.

As escamas androconiais dos lepidópteros em estudo seguem o padrão já descrito para outras borboletas *Heliconius* estudadas (MOORE, 2014). Em outras tribos de Nymphalidae e em outras famílias, a estrutura externa das escamas androconiais é muito diferente dos resultados aqui apresentados.

Uma escama com maior largura e menor comprimento eliminaria melhor os compostos voláteis, seja por ação mecânica durante o voo, por exemplo. Os voláteis também seriam emitidos mais facilmente pela ação do calor. Assim, estas escamas conteriam menos voláteis no momento em que os machos são coletados, uma vez que possivelmente teriam sido emitidos naturalmente durante o voo e ou na exposição ao sol/calor. As escamas com largura menor e comprimento maior não eliminariam os compostos voláteis tão facilmente. A escama mais longa e mais fina dificultaria a emissão de voláteis durante a ação mecânica do voo. Além disso, a menor área superficial de exposição impediria uma emissão natural de voláteis pela ação do calor.

Assim, essas escamas conteriam mais voláteis no momento em que os machos são coletados, uma vez que podem não ter sido emitidos naturalmente durante o voo e/ou na exposição ao sol/calor. Com base nas afirmações acima, pode-se propor que *Heliconius erato phyllis* tenha uma vantagem maior sobre os outros Lepidoptera em estudo por ter escamas androconiais de maior largura e menor comprimento. Portanto, eles seriam mais eficientes na eliminação de voláteis durante a vibração das asas masculinas sobre a fêmea, para torná-la apta para o acasalamento e, possivelmente, para facilitar o reconhecimento interespecífico.

As vesículas presentes no lúmen das escamas androconiais são estruturalmente semelhantes à "bola" de vesículas que ocorre na saída da luz do pedicelo da escama androconial de *Caligo eurilochus* (Lepidoptera: Nymphalidae: Brassolinae), que teria a função de evitar o refluxo da secreção devido ao seu efeito capilar (WASSERTHAL & WASSERTHAL, 1977). A rede interna da escama androconial de *Teinopalpus*, *Pieris rapae* L., *Anthocharis cardamines* L. e *Gonepteryx rhamni* L. (GHIRADELLA, 1980), é semelhante à rede de estruturas internas encontradas na escama androconial dos Lepidoptera em estudo.

Os presentes resultados sugerem que a emissão de voláteis do feromônio ocorre através dos poros e da abertura superior da escama. As vesículas entrariam em colapso, liberando voláteis de feromônio devido ao atrito das lâminas laterais da escama, devido ao movimento vibratório das asas masculinas durante o corte. Outra hipótese os voláteis seriam liberados a partir da secreção de feromônios presente nos espaços vazios, sem lisar as vesículas. As imagens de MEV obtidas do interior das escamas dos lepidópteros estudadas mostram que onde as vesículas são mais espaçadas, o atrito das lâminas das escamas seria mais eficiente na ruptura das vesículas, como em *H. erato phyllis* e *Heliconius ethilla narcaea*. Em *Heliconius besckei*, as vesículas estão mais unidas, com poucos espaços entre elas, o que dificultaria o deslocamento das lâminas da escama. Isso geraria pouco atrito, pouca ruptura e, portanto, pouca saída de voláteis de feromônio. A origem das vesículas ainda não é esclarecida, bem como a substituição após possível ruptura. Investigações da ultraestrutura de unidades produtoras de odores (cada uma consistindo de uma célula glandular, uma cavidade cuticular e uma escama) são importantes quando se trata de entender o mecanismo de liberação de voláteis afrodisíacos em heliconínios.

Como os lepidópteros estudados são simpátricos esperava-se uma maior distinção na composição dos compostos como concluído por Mann *et al.* (2017). Mas

este fato não foi verificado com as espécies *H. ethilla narcaea* e *H. besckei*. *Heliconius besckei* foi uma espécie difícil de ser encontrada em locais onde antes eram abundantes. As características aqui apresentadas com relação aos seus feromônios afrodisíacos com semelhança química com outra espécie, e morfologia da escama androconial que não facilitaria a comunicação sexual, podem ser as causas para uma possível extinção da espécie que parece estar se delineando.

## REFERÊNCIAS

- ABE, F.; YAMAUCHI, T. Affinoside A and Companion Glycosides from the Stem and Bark of *Anodendron affine*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, n. 30, v. 4, p. 1183–1193, 1982.
- ANDERSON, A. R.; WANNER, K. W.; TROWELL, S. C.; WARR, C. G.; JAQUIN-JOLY, E.; ZAGATTI, P.; ROBERTSON, H.; NEWCOMB, R. D. Functional analysis of female-biased odorant receptors from the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 189–197, 2009.
- ANDERSSON, J., BORG-KARLSON A., VONGVANICH N. & WIKLUND C. Male sex pheromone release and female mate choice in a butterfly. **Journal of Experimental Biology**, 210, 964–970, 2007.
- ANDERSSON, J.; BORG-KARLSON, A. K.; WIKLUND, C. Antiaphrodisiacs in pierid butterflies: a theme with variation! **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, p. 1489–1499, 2003.
- ANDERSSON, J.; BORG-KARLSON, A. K.; WIKLUND, C. Sexual cooperation and conflict in butterflies: a male-transferred anti-aphrodisiac reduces harassment of recently mated females. **Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences**, v. 267, p. 1271–1275, 2000.
- ANDERSSON, M. **Sexual Selection**. Princeton, NJ: Princeton University Press, p. 599, 1994.
- AUSSEM, B. Eine neue satyride der gattung *Pseudochazara* de Lesse, 1951 aus Afghanistan (Satyridae). **Nota Lepidopterologica**, v. 3, p. 5–15, 1980.
- AYMONE, A. C. B., VALENTE, V. L. S. & ARAÚJO, A. M. Ultrastructure and morphogenesis of the wing scales in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae): What silvery/brownish surfaces can tell us about the development of color patterning? **Arthropod Structure & Development**, v. 42, p. 349–359, 2013.
- BAKER, T. C.; CARDÉ, R. T. Courtship behavior of the oriental fruit moth (*Grapholita molesta*): experimental analysis and consideration of the role of sexual selection in the evolution of courtship pheromones in the Lepidoptera. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 72, n. 1, p. 73–88, 1979.
- BARROZO, R. B.; KAISLING, K. E. Repetitive stimulation of olfactory receptor cells in female silkmoths *Bombyx mori* L. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, p. 825–834, 2002.
- BARTH, R. Maennliche Duf torgane Brasilianischer lepidopteren. 22. Mitteilung: *Hammaptera frondosata* Guer. (Geometridae, Lareintiinae). **Instituto Oswaldo Cruz**, n. 31, v. 4, p. 567–576, 1959.
- BARTH, R. O órgão odorífero abdominal do macho de *Caligo arisbe* Hbn. (Lepidoptera, Brassolidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 51, p. 203–219, 1953.
- BARTH, R. Os órgãos odoríferos masculinos de alguns Heliconiinae do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 50, p. 335–385, 1952.
- BEEBE, W.; CRANE, J.; FLEMING, H. A comparison of eggs, larvae and pupae fourteen species of Heliconiinae butterflies from Trinidad, W. I. **Zoologica**, v. 45, p. 111–153, 1960.



- BERGSTRÖM, G.; LUNDGREN, G. Androconial secretion of three species of butterflies of the genus *Pieris* (Lep., Pieridae). **Zoon Supplement**, v. 1, p. 67–75, 1973.
- BIRCH, M. C., POPPY, G. M., BAKER, T. C. Scents and reversible structures of male moths. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 25–58, 1990.
- BOPPRÉ, M. & VANE-WRIGHT, R. I. Androconial systems in Danainae (Lepidoptera): functional morphology of *Amauris*, *Danaus*, *Tirumala* and *Euploea*. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 97, p. 101–133, 1989.
- BOPPRÉ, M. Insects pharmacophagously utilizing defensive plant chemicals (pyrrolizidine alkaloids). **Naturwissenschaften**, v. 73, p. 17–26, 1986.
- BOPPRÉ, M. Lepidoptera and pyrrolizidine alkaloids, exemplification of complexity in chemical ecology. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, p. 165–185, 1990.
- BORGES, E. De O.; FACCIONE-HAUSER, M. C.; MOREIRA, G. P. R. Morphology of the prosternal glands of *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae), 2010. **Psyche**.
- BROWER, L. P., BROWER, J. V. Z.; CRANSTON, F. P. Courtship behaviour of the queen butterfly, *Danaus gilippus berenice* (Cramer). **Zoologica**, v. 50, p. 1–39, 1965.
- BROWN, J. A review of the genus *Pseudochazara* de Lesse, 1951 (Lep., Satyridae) in Greece. **Entomologist's Gazette**, v. 27, p. 85–90, 1976.
- BROWN, K. S. Chemical ecology of dehydropyrrolizidine alkaloids in adult Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 44, p. 435–460, 1984.
- BUTENANDT, A.; BECKMANN, R.; STAMM, D.; HECKER, E. Über den sexuallockstoff des seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und Konstitution. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 14b, p. 283–284, 1959.
- BUTENANDT, A.; HECKER, E. Synthese des bombykols, des sexual-lockstoffes des seidenspinners, und seiner geometrischen Isomeren. **Angewandte Chemie**, v. 73, p. 349–353, 1961.
- CLUTTON-BROCK, T. H.; PARKER, G. A. Sexual coercion in animal societies. **Animal Behaviour**, v. 49, p. 1345–1365, 1995. <https://doi.org/10.1006/anbe.1995.0166>
- CONDAMIN, M. **Monographie du genre *Bicyclus* (Lepidoptera: Satyridae)**. Dakar: IFAN, 1973.
- COSTANZO, K.; MONTEIRO, A. The use of chemical and visual cues in female choice in the butterfly *Bicyclus anynana*. **Proceedings of the Royal Society**, v. 274, p. 845–851, 2007.
- DARRAG, K., VANJARI, S., MANN, F., GONZALEZ-ROJAS, M. F., MORRISON, C. R., SALAZAR, C., PARDO-DIAZ, C., MERRILL, R. M., MCMILLAN, W. O., SCHULZ, S. & JIGGINS, C. Male sex pheromone components in *Heliconius* butterflies released by the androconia affect female choice. **PeerJ**, v. 5, p. e3953, 2017. <https://peerj.com/articles/3953/>
- DE BRITO SANCHEZ, M. G.; KAISLING, K. E. Inhibitory and excitatory effects of iodoben-zene on the antennal benzoic acid receptor cell of the female silk moth *Bombyx mori* L. **Chemical Senses**, v. 30, p. 435–442, 2005.
- DEINERT, E. I., LONGINO, J. T., GILBERT, L. E. Mate competition in butterflies. **Nature**, v. 370, p. 23–24, 1994. <https://doi.org/10.1038/370023a0>
- DOWNEY, J. C. & ALLYN, A. C. Wing-scale Morphology and Nomenclature. **Bulletin of the Allyn Museum**, v. 31, p. 1–32, 1975.

DUSSORD, D. E., HARVIS, C. A., MEINWALD, J. & EISNER, T. Pheromonal advertisement of a nuptial gift by a male moth (*Utetheisa ornatrix*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 9224–9227, 1991. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.20.9224>

EDGAR, J. A.; CULVENOR, C. C. J.; PLISKE, T. E. Isolation of a lactone, structurally related to the esterifying acids of pyrrolizidine alkaloids, from the coastal fringes of male Ithomiinae. **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, p. 263–270, 1976.

EDWARDS, W. H. On certain habits of *Heliconia charitonia* Linn., a species of butterfly found in Florida. **Papilio**, v. 1, p. 209–215, 1881.

EL-SAYED A. M. **The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals**. 2003-2018. Disponível em: <http://www.pherobase.com> Acesso em 2017.

Estrada, C. **Sexual behavior, intraspecific signaling and the evolution of mimicry among closely related species**. Ph.D. Thesis, University of Texas, Austin, 2009.

ESTRADA, C., GILBERT, L. E. Host plants and immatures as mate-searching cues in *Heliconius* butterflies. **Animal Behaviour**, v. 80, p. 231–239, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.04.023>

FORSBERG, J.; WIKLUND, C. Mating in the afternoon: time-saving in courtship and remating by females of a polyandrous butterfly *Pieris napi*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 25, p. 349–356, 1989.

GHIRADELLA, H. Hairs, Bristles, and Scales. In: **Microscopic anatomy of invertebrates**. Wiley-Liss. Inc. Vol 11A, Insecta, p 257–287, 1998.

GHIRADELLA, H. Insect Cuticular Surface Modifications: Scales and Other Structural Formations. In **Advances in insect physiology**, Vol. 38, Elsevier Ltd., 2010. ISBN 978-0-12-381389-3 [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(10\)38006-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(10)38006-4)

GILBERT, L. E. Biodiversity of a Central American *Heliconius* community: pattern, process and problems. In: Price PW, Fernandes GW, Benson WW (eds) **Plant-animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions**. Wiley, New York, p. 403–427, 1991.

GILBERT, L. E. Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plants. In L. E. Gilbert & P. H. Raven (Eds.), **Coevolution of animals and plants** (pp. 210–240, 1975). Austin and London: University of Texas Press.

Gilbert, L. E. Postmating female odor in *Heliconius* butterflies: a male contributed anti-aphrodisiac? **Science**, v. 193, p. 419–420, 1976.

GRANT, G. G.; BRADY, U. E. Courtship behavior of phycitid moths: Comparison of *Plodia interpunctella* and *Cadra cautella* and role of male scent glands. **Canadian Journal of Zoology**, v. 53, p. 813–826, 1975.

GROSS, F. J. Beitrag zur Systematik von *Pseudochazara*-Arten (Lep., Satyridae). **Atalanta Wurzburg**, v. 9, p. 41–103, 1978.

HARTLIEB, E.; ANDERSON, P. Olfactory-released behaviours. In: **Insect olfaction** (ed. B. S. Hanson), pp. 315–349, Berlin, Germany: Springer, 1999.

HARTMANN, T.; OBER, D. Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. In: **Topics in current chemistry: biosynthesis: Aromatic polyketides, isoprenoids, alkaloids**. Springer, Berlin, pp. 207–243, 2000.



HEDENSTRÖM, E.; WALLIN, E. A.; ANDERSSON, J.; BÄNG, J.; WANG, H. L.; LÖFSTEDT, C.; BRATTSTRÖM, O.; BAQUET, P. Stereoisomeric analysis of 6,10,14-trimethylpentadecan-2-ol and the corresponding ketone in wing extracts from African *Bicyclus* butterfly species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 41, p. 44–51, 2015.

HEINBOCKEL, T.; KAISSLING, K. E. Variability of olfactory receptor neuron responses of female silkmoths (*Bombyx mori* L.) to benzoic acid and (+)-linalool. **Journal of Insect Physiology**, v. 42, p. 565–578, 1996.

IYENGAR, V. K., ROSSINI, C. & EISNER, T. Precopulatory assessment of male quality in an arctiid moth (*Uthetiesa ornatix*): hydroxydanaidal is the only criterion of choice. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 49, 283–288, 2001.

Kaissling, K. E.; Kasang, G.; Bestmann, H. J.; Stransky, W.; Vostrowsky, O. A new pheromone of the silkworm moth *Bombyx mori*. **Naturwissenschaften**, v. 65, p. 382–384, 1978.

KASANG, G.; KAISSLING, K. E.; VOSTROWSKY, O.; BESTMANN, H. J. Bombykal, a second pheromone component of the silkworm moth *Bombyx mori*. L. **Angewandte Chemie**, v. 90, p. 74–75, or **Angewandte Chemie International Edition England**, v. 17, p. 60, 1978b.

KASANG, G.; SCHNEIDER, D., SCHÄFER, W. The silkworm moth *Bombyx mori*. Presence of the (*E,E*)-stereoisomer of bombykol in the female pheromone gland. **Naturwissenschaften**, v. 65, p. 337–338, 1978a.

KLEIN, A. L. & ARAÚJO, A. M. Courtship behavior of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae) towards virgin and mated females: conflict between attraction and repulsion signals? **Journal of Ethology**, 28, 409–420, 2010.

KRISTENSEN, N. P. & SIMONSEN, T. J. Hairs and scales. In Kristensen NP, Simonsen TJ (eds), **Lepidoptera, moths and butterflies**, (Handbook of Zoology, IV/36, Vol. 2: Morphology, physiology, and development, pp 9–22). Berlin and New York: Walter de Gruyter, 2003.

LARSDOTTER-MELLSTROM, H.; ERIKSSON, K.; JANZ, N.; NYLIN, S.; CARLSSON, M. A. Male butterflies use an anti-aphrodisiac pheromone to tailor ejaculates. **Functional Ecology**, v. 30, p. 255–261, 2016.

LARSEN, T. B. **Butterflies of West Africa**. Stenstrup, Denmark: Apollo Books, 2005.

LIÉNARD, M. A.; WANG, H.-L.; LASSANCE, J-M; LÖFSTEDT, C. Sex pheromone biosynthetic pathways are conserved between moths and butterfly *Bicyclus anynana*. **Nature Communications**, v. 5, p. 3957, 2014.

MANN, F., VANJARI, S., ROSSER, N., MANN, S., DASMAHAPATRA, K. K., CORBIN, C., LINARES, M., PARDO-DIAZ, C., SALAZAR, C., JIGGINS, C. & SCHULZ, S. The scent chemistry of *Heliconius* wing androconia. **Journal of Chemical Ecology**, n. 43, v. 9, p. 843–857, 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28791540>

MEINWALD, J.; MEINWALD, Y. C.; MAZZOCHI, P. H. Sex pheromone of the queen butterfly: chemistry. **Science**, v. 164, p. 1174-1175, 1969.

Meinwald, J.; Meinwald, Y. C.; Wheeler, J. W.; Eisner, T.; Brower, L. P. Major components in the exocrine secretion of a male butterfly (*Lycorea*). **Science**, v. 151, p. 583-585, 1966.

MOORE, M. E. **Wing scale morphology of a sexually dimorphic color pattern element in the butterfly co-mimics *Heliconius melpomene* and *Heliconius erato*.**

Bachelor of Arts Honors Thesis; Faculty of Mount Holyoke College, South Hadley, Massachusetts, 2014.

MÜLLER, F. IX. The “Maracujá (or Passion-flowers) butterflies”. In Longmans, Green, and Co (Eds.), **Butterfly-hunting in many lands** (p. 651–667). London: G. B. Longstaff, 1912.

MYERS, J. Pheromones and courtship behavior in butterflies. **American Zoologist**, v. 12, p.545–551, 1972.

NIEBERDING, C. M., DE VOS, H., SCHNEIDER, M. V., LASSANCE, J., ESTRAMIL, N., ANDERSSON, J., BANG, J., HEDENSTRÖM, E., LOFSTEDT, C. & BRAKEFIELD, P. M. The male sex pheromone of the butterfly *Bicyclus anynana*: towards an evolutionary analysis. **Public Library of Science**, one, v. 3, p. e2751, 2008.

NIEBERDING, C. M.; FISCHER, K.; SAASTAMOINEN, M.; ALLEN, C. E.; WALLIN, E. A.; HEDENSTRÖM, E.; BRAKEFIELD, P. M. Cracking the olfactory code of a butterfly: the scent of ageing. **Ecology Letters**, v. 15, 2012.

NISHIDA, R.; KIM, C. S.; FUKAMI, H.; IRIK, R. Ideamine N-Oxides: Pyrrolizidine alkaloids sequestered by the danaine butterfly, *Idea leuconoe*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, p. 1787-1792, 1991.

NISHIDA, R.; SCHULZ, S.; KIM, C. S.; FUKAMI, H., KUWAHARA, Y.; HONDA, I. K.; HAYASHI, N. Male sex pheromone of a giant danaine butterfly, *Idea leuconoe*. *Journal of Chemical Ecology*, n. 22, v. 5, p. 949-72, 1996.

NOIROT, C., QUENNEDEY, A. Fine structure of insect epidermal glands. **Annual Review of Entomology**, v. 19, p. 61–80, 1974.

OBARA, Y. Mating behaviour of the cabbage white, *Pieris rapae crucivora* II: the “mate-refusal” posture of the female. **Zoologisches Magazin**, v. 73, p. 175-178, 1964.

OKUMURA Y, OZEKI Y, ITOH T, OHTA S, ÔMURA H (2016) Volatile terpenoids from male wings lacking scent scales in *Anthocharis scolymus* (Lepidoptera: Pieridae). **Applied Entomology And Zoology**,

ORR, A. G.; TRIGO, J. R.; WITTE, L.; HARTMANN, T. Sequestration of pyrrolizidine alkaloids by larvae of *Tellervo zoilus* (Lepidoptera: Ithomiinae) and their role in the chemical protection of adults against the spider *Nephila maculata* (Araneidae). **Chemoecology**, v. 7, p. 68–73, 1996.

PIVNICK, K. A.; LAVOIEDORINIK, J., MCNEIL, J. N. The role of the androconia in the mating behavior of the European skipper, *Thymelicus lineola*, and evidence for a male sex-pheromone. **Physiological Entomology**, v. 17, p. 260–268, 1992.

PLISKE, T. E. Courtship behavior of the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 68, p. 143-151, 1974.

PLISKE, T. E.; EDGAR, J.A.; CULVENOR, C. C. J. The chemical basis of attraction of Ithomiine butterflies to plants containing pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Chemical Ecology**, n. 3, v. 2, p. 255–262, 1976.

PLISKE, T. E.; EISNER, T. Sex pheromone of the queen butterfly: biology. **Science**, v. 154, p. 1170-1172, 1969.

PLISKE, T. E.; SALPETER M. M. The structure and development of the hairpencil glands in males of the queen butterfly, *Danaus gilippus berenice*. **Journal of Morphology**, v. 134, p. 215–242, 1971.

PRIESNER, E. Progress in the analysis of pheromone receptor systems. **Annales de Zoologie Ecologie Animale**, v. 11, p. 533–546, 1979.

PRUDIC, K. L.; JEON C, CAO, H.; MONTEIRO, A. Developmental plasticity in sexual roles of butterfly species drives mutual sexual ornamentation. **Science**, v. 331, n. 73, 2011.

R DEVELOPMENT CORE TEAM R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, 2016. <http://www.R-project.org/Rangel>

RAUSER, C. L. & RUTOWSKI, R. L. Male-specific structures on the wings of the Gulf Fritillary butterfly, *Agraulis vanillae* (Nymphalidae). **Journal of the Lepidopterists' Society**, v. 57, p. 279–283, 2003.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208–212, 1963.

ROBERTSON, K. A.; MONTEIRO, A. Female *Bicyclus anynana* butterflies choose males on the basis of their dorsal UV-reflective eyespot pupils. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 272, p. 1541–1546, 2005.

RUTOWSKI, R. L. Male scent-producing structures in *Colias* butterflies: function, localization, and adaptive features. **Journal of Chemical Ecology**, v. 6, p. 13–26, 1980.

RUTOWSKI, R. L. Sexual selection and the evolution of butterfly mating behaviour. **Journal of Research on the Lepidoptera**, v. 23, p. 125–142, 1984.

SCHNEIDER, D.; SCHULZ, S.; PRIESNER, E.; ZIESMANN, J.; FRANCKE, W. Autodetection and chemistry of female and male pheromone in both sexes of the tiger moth *Panaxia quadripunctaria*. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 182, p. 153–161, 1988.

SCHULZ, S. Absolute configuration and synthesis of 2-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-3-methyl-cbutyrolactone, a presumed pheromone of ithomiine butterflies. **Liebigs Annalen der Chemie**, p. 829–834, 1992.

SCHULZ, S.; BECCALONI, G.; BROWN J. R., K. S.; BOPPRÉ, M.; FREITAS, A. V. L., OCKENFELS, P.; TRIGO, J. R. Semiochemicals derived from pyrrolizidine alkaloids in male ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 699–713, 2004.

SCHULZ, S.; BOPPRÉ, M.; VANE-WRIGHT, R. I. Specific mixtures from secretions of male sex scent-organs of African Milkweed butterflies (Danainae). **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 342, p. 161–181, 1993.

SCHULZ, S.; ESTRADA, C.; YILDIZHAN, S.; BOPPRÉ, M.; GILBERT, L. E. An anti-aphrodisiac in *Heliconius melpomene* butterflies. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 82–93, 2008.

SCHULZ, S.; FRANCKE, W.; EDGAR, J. A.; SCHNEIDER, D. Volatile compounds from androconial organs of danaine and Ithomiine butterflies. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 43c, p. 99–104, 1988.

SCHULZ, S.; NISHIDA, R. The pheromone system of the male danaine butterfly, *Idea leucone*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 341–349, 1996.

SCHULZ, S.; YILDIZHAN, S.; STRITZKE, K.; ESTRADA, C.; GILBERT, L. E. Macrolides from the scent glands of the tropical butterflies *Heliconius cydno* and

*Heliconius pachinus*. **Organic and Biomolecular Chemistry**, n. 5, v. 21, p. 3434–3441, 2007.

SCOBLE, M. J. **The Lepidoptera: Form, Function and Diversity**. Oxford University Press, p. 404, 1992.

SCOTT, J. A. Mating of butterflies. **Journal of Research on the Lepidoptera**, v. 11, p. 9–127, 1972.

SELLIER, R. Etude morphologique en microscopie électronique à balayage de quelques types d'androcoïnes alaires chez les Lépidoptères diurnes. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences Paris**, v. 273, p. 2550–2553, 1971.

SELLIER, R. Etude ultrastructurale en microscopie électronique à balayage et essai d'interprétation du mode de fonctionnement des poils androconiaux alaires chez les Hesperiiidae (Lepidoptera Rhopalocera). **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, v. 275, p. 2239–2242, 1972.

SHUSTER, S. M. Sexual selection and mating systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, p. 10009–10016, 2009.

SOURAKOV, A. Pupal mating in Zebra longwing (*Heliconius charithonia*): Photographic evidence. **News of the Lepidopterists Society**, v. 50, p. 26–32, 2008.

STEINBRECHT, R. A. Feinstruktur und Histochemie der Sexualduftdrüse des seidenspinners *Bombyx mori*. **Zeitschrift für Zellforschung**, v. 64, p. 227–261, 1964.

STRITZKE, K.; SCHULZ, S.; NISHIDA, R. Absolute configuration and synthesis of b- and d-lactones present in the pheromone system of the giant white butterfly *Idea leuconoe*. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 22, v. 2002, p. 3699–3892, 2002.

TINBERGEN, N., MEEUSE, B. J. D., BOEREMA, L. K. & VAROSSIEAU, W. W. Die balz des samtfalters, *Eurema* (= *Satyrus*) *semele*. **Zeitschrift für Tierpsychologie**, v. 5, p. 182–226, 1942.

TRIGO, J. R.; BARATA, L. E. S.; BROWN, K. S. Stereochemical inversion of pyrrolizidine alkaloids by *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae): Specificity and evolutionary significance. **Journal of Chemical Ecology**, n. 20, v. 11p. 2883–99, 1994.

TRIGO, J. R.; BROWN, K. S. Variation of pyrrolizidine alkaloids in Ithomiinae: a comparative study between species feeding on Apocynaceae and Solanaceae. **Chemoecology**, n. 1, v. 1, p. 22–29, 1990.

TRIGO, J. R.; BROWN, K. S.; HENRIQUES, S. A.; BARATA, L. E. S. Qualitative patterns of pyrrolizidine alkaloids in Ithomiinae butterflies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, p. 181–188, 1996.

TUZOV, V. K. (Ed.) **Guide to the butterflies of russia and adjacent territories.I. Hesperiiidae, Papilionidae, Pieridae, Satyridae**. Sofia. 480 pp., 1997.

VAN BERGEN, E.; BRAKEFIELD, P. M.; HEUSKIN, S.; ZWAAN, B. J.; NIEBERDING, C. M. The scent of inbreeding: a male sex pheromone betrays inbred males. **Proceedings of the Royal Society**, v. 280, p. 20130102, 2013.

VANE-WRIGHT, R. I.; BOPPRE, M. Visual and chemical signaling in butterflies: functional and phylogenetic perspectives. **Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences**, v. 340, p. 197–205, 1993.

- WAKEHAM-DAWSON, A. Discriminant analysis of androconia in the genus *Pseudochazara* de Lesse, 1951 (Lepidoptera; Satyridae). **Entomologist's Gazette**, v. 48, p. 37–46, 1997.
- WALTERS, J. R.; STAFFORD, C.; HARDCASTLE, T. J.; JIGGINS, C. D. Evaluating female remating rates in light of spermatophore degradation in *Heliconius* butterflies: Pupal-mating monandry versus adult-mating polyandry. **Ecological Entomology**, v. 37, p. 257–268, 2012..
- WANG, H.-L., BRATTSTRÖM, O., BRAKEFIELD, P. M., FRANCKE W. & LÖFSTEDT, C. Identification and biosynthesis of novel male specific esters in the wings of the tropical butterfly, *Bicyclus martius sanaos*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, p. 549–559, 2014. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10886-014-0452-y>
- WASSERTHAL, L. T. & WASSERTHAL W. Ultrastructure of a scent scale organ with pressure discharge in male *Caligo eurilochus brasiliensis* (Fldr.) (Lepidoptera: Brassolidae). **Cell and Tissue Research**, n. 177, v. 9, p. 87–103, 1977.
- WIKLUND, C.; FORSBERG, J. Courtship and male discrimination between virgin and mated females in the orange tip butterfly, *Anthocharis cardamines*. **Animal Behavior**, v. 34, p. 328-332, 1985.
- WILLIS, A. A.; BIRCH, M. C. Male lek formation and female calling in a population of the arctiid moth, *Estigmene acrea*. **Science**, v. 218, p. 168–170, 1968.
- WUNDERER, H.; HANSEN, K.; BELL, T. W.; SCHNEIDER, D.; MEINWALD, J. Sex pheromones of two Asian moths (*Cretonotos transiens*, *C. gangis*; Lepidoptera—Arctiidae): behavior, morphology, chemistry and electrophysiology. **Experimental Biology**, v. 46, p. 11–27, 1986.
- WYATT, T. D. **Pheromones and Animal Behaviour**. NewYork, NY:Cambridge UniversityPress, 2003.
- ZIESMANN, J; VALTEROVA, I; HABERKORN, K; DE BRITO SANCHEZ. M. G., KAISLING, K. E. Chemicals in laboratory room air stimulate olfactory neurons of female *Bombyx mori*. **Chemical Senses**, v. 25, p. 31–37, 2000.

Capítulo III. AS INTERAÇÕES QUÍMICAS INSETO-INSETO – FEROMÔNIOS  
ANTIAFRODISÍACOS



## RESUMO

CAPÍTULO III. As glândulas odoríferas abdominais presentes nas valvas do macho dos lepidópteros aqui estudados apresentam um *bouquet* antiafrodisíaco que é transferido durante a cópula para o saco odorífero abdominal da fêmea, inflável e exibido durante o comportamento de corte e em situações de defesa. Diante disso, o presente estudo apresenta os compostos químicos voláteis presentes nos *bouquets* odoríferos relacionados à glândula e à bolsa odorífera abdominal de *Heliconius erato phyllis*, *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei*. As implicações decorrentes da composição química, similaridades e diferenças existentes nos *bouquets*, são analisadas à luz da ecologia química. A abordagem metodológica partiu de uma revisão bibliográfica sobre os temas abordados e consistiu em análises morfológicas de MO e MEV, análises químicas de cromatografia em fase gasosa e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, dos voláteis emitidos e em análises comportamentais através de bioensaios e eletroantenografia. Como resultado das análises morfológicas verificou-se que existem projeções translúcidas sobre os lobos do saco odorífero abdominal da fêmea, que consistem em paredes que delimitam tanques ou cisternas de armazenamento do feromônio antiafrodisíaco, que variam em número e tamanho nos lepidópteros estudados. *H. erato phyllis* apresentou maior número de tanques de menor tamanho, seguida por *H. ethilla narcaea* e *H. besckei* com cisternas maiores e semelhantes morfológicamente. As valvas do macho apresentam na extremidade afilada da superfície interna, denticulos, que variam em número e forma na espécie e subespécies estudadas, que provavelmente estão relacionados com apreensão da bolsa odorífera abdominal da fêmea durante a cópula. *H. erato phyllis* apresentam os denticulos mais afilados e compatíveis com a função preênsil; as demais, espécie e subespécie apresentam denticulos em menor quantidade e pouco compatíveis com a função preênsil. *Heliconius ethilla narcaea* apresenta dentes somente na porção final da extremidade afilada, e *Heliconius besckei* apresenta a extremidade curva e dentes a partir da região mediana da extremidade afilada. Como resultado das análises químicas, verificou-se que as glândulas odoríferas abdominais do macho de *H. erato phyllis* possui os compostos bioativos: 1-hexen-3-ona, 1-octen-3-ona, (*E*)- $\beta$ -ocimeno, 3-undecanona, (*E*)-3,7,11-trimetiloxacicoundec-7-en-2-ona e ácido (*E*)-2,3-dihidrofarnesóico, com transferência quantitativa média de 84.93% (oitenta e quatro vírgula noventa e três por cento) do bouquet de compostos ativos do macho para a fêmea. O macho de *H. ethilla narcaea* possui os compostos: (*E*)- $\beta$ -ocimeno, (*Z*)-heneicos-9-eno, heneicosano, (*Z*)-octadec-9-enoato de etila, (11*Z*)-eicos-11-enol, (9*Z*)-tricos-9-ano, (*Z*)-octadec-9-enoato de butila e docosan-1-ol, quantitativamente com transferência média de 22,96% (vinte e dois vírgula noventa e seis por cento) do bouquet para a fêmea. O macho de *H. besckei* possui os compostos: (*E*)- $\beta$ -ocimeno, octadecanol, heneicosano, (11*Z*)-eicos-11-enol, (9*Z*)-tricos-9-ano, tetracosano, (13*Z*)-docos-13-enal e docosan-1-ol, o percentual de transferência média do bouquet odorífero não foi calculado para esta espécie. Assim sendo comparando-se os resultados das quantificações dos compostos e a morfologia da glândula odorífera abdominal em cada lepidóptero conclui-se que possivelmente a fêmea de *H. erato phyllis* armazena mais eficientemente os compostos, seguida de *H. ethilla narcaea* e *H. besckei*, pois possuem a morfologia do saco odorífero abdominal semelhante. Bioensaios e análises eletroantenográficas comprovaram a função antiafrodisíaca do buquê odorífero da valva do macho de *H. erato phyllis* e mostraram que o composto (*E*)-3,7,11-trimetiloxacicoundec-7-en-2-ona é um composto antiafrodisíaco específico do macho. O (*E*)- $\beta$ -ocimeno é possivelmente um composto antiafrodisíaco interespecífico.

Palavras-chave: Glândula odorífera abdominal. Ecologia química. Borboletas.  
Vantagens morfológicas.



## ABSTRACT

CHAPTER III. The abdominal scent glands present in the male lepidopterans' valves studied here have an anti-aphrodisiac bouquet that is transferred during intercourse to the inflatable female abdominal scent bag and exhibited during the cutting behavior and in defense situations. Therefore, the present study investigates the volatile chemical compounds found in the odoriferous bouquets related to the abdominal scent gland and bag of *Heliconius erato phyllis*, *Heliconius ethilla narcaea* and *Heliconius besckei*. The implications of chemical composition, similarities and differences in bouquets are analyzed in the light of chemical ecology. The methodological approach was based on a literature review of the themes and consisted of morphological analysis of OM and SEM, chemical analysis of gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry, the emitted volatile and behavioral analysis through bioassays and electroantennography. As a result of the morphological analyses, it was confirmed that there are translucent projections on the lobes of the female odoriferous sac, which consists of walls that delimit tanks or storage cisterns of the anti-aphrodisiac pheromone, varying in number and size in the lepidopterans under study. *H. erato phyllis* presented a larger number of smaller tanks, followed by *H. ethilla narcaea* and *H. besckei*, with morphologically similar cisterns. The male valves present at the tapered end of the inner surface, denticles, which vary in number and shape in the species and subspecies in question and are probably related to apprehension of the female's abdominal scent sac during intercourse. *H. erato phyllis* present the most refined denticles, compatible with the apprehension function. *Heliconius ethilla narcaea* only presents teeth at the end portion of the tapered end, and *H. besckei* presents a curved end and teeth from the medial region of the tapered end. As a result of the chemical analyses, it was found that the abdominal odoriferous glands of *H. erato phyllis* males had the following bioactive compounds: 1-hexen-3-one, 1-octen-3-one, (*E*)- $\beta$ -ocimene, 3-undecanone, (*E*)-3,7,11-trimethyloxacycloundec-7-en-2-one, and (*E*)-2-3-dihydrofarnesoic acid with a quantitative mean transfer of 84.93% (eighty-four point nine three percent) of bioactive bouquet from the male to the female. The *H. ethilla narcaea* male contains the following compounds: (*E*)- $\beta$ -ocimene, (*Z*)-heneicos-9-ane, heneicosane, ethyl (*Z*)-octadec-9-enoate, (11*Z*)-eneicos-11-an ol, (9*Z*)-tricos-9-ane, butyl, (*Z*)-octadec-9-enoate and docosan-1-ol, with a quantitative mean transfer of 22.96% (twenty-two, point ninety-six percent) of the bouquet to the female. The *H. besckei* male possesses the following compounds: (*E*)- $\beta$ -ocimene, octadecanol, heneicosane, (11*Z*)-eicos-11-enol, (9*Z*)-tricos-9-ane, tetracosane, (13*Z*)-docos-13-enal and docosan-1-ol. The test to determine the percentage of mean transference of the odoriferous bouquet was not performed for this species. Thus, comparing the results of the compounds' quantifications and morphology of each abdominal scent gland of the lepidopterans, it is concluded that the *H. erato phyllis* female possibly stores the compounds found in the odorous bouquets more efficiently; followed by *H. ethilla narcaea* and *H. besckei*, because they have abdominal scent bag with similar morphology. Bioassays and electroantennography analysis confirmed the anti-aphrodisiac function of the odorous bouquet of the valve of the male *H. erato Phyllis* and showed that the compound (*E*)-3,7,11-trimethylxacycloundec-7-en-2-one is a male specific anti-aphrodisiac compound. The ocimene is possibly an interspecific anti-aphrodisiac compound.

Keywords: Abdominal scent gland. Chemical ecology. Butterflies. Morphological advantages.

## 1 INTRODUÇÃO

Os antiafrodisíacos funcionam de forma antagônica aos feromônios afrodisíacos e comumente eles irão promover a rejeição sexual intraespecífica de um indivíduo pelo indivíduo do sexo oposto. Os voláteis antiafrodisíacos são sinais químicos transferidos de machos para fêmeas durante o acasalamento, que temporariamente ou não, reduzem a atratividade da fêmea para a corte posterior de machos. Descrito pela primeira vez para o besouro *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Happ 1969) (Coleoptera, Tenebrionidae), eles já foram encontrados em várias taxa, incluindo *Drosophila melanogaster* Meigen 1830 (Diptera, Drosophilidae), serpentes, e diversas espécies de abelhas, percevejos, gafanhotos, besouros, moscas e borboletas (HAPP, 1969; GILBERT, 1976; ROSS & CREWS, 1977; KUKUK, 1985; SCOTT, 1986; ANDERSSON *et al.*, 2000; AYASSE *et al.*, 2001; ANDERSSON *et al.*, 2003; ZHANG & ALDRICH, 2003; ANDERSSON, 2004; SEIDELMANN, 2006; KYRIACOU, 2007; SCHULZ *et al.*, 2008). Em lepidópteros pode tornar-se em um instrumento de controle do macho sobre um novo acasalamento da fêmea (ANDERSSON *et al.*, 2000; ANDERSSON *et al.*, 2003; ANDERSSON, 2004), e sua existência em borboletas foi sugerida pela primeira vez para *Heliconius erato* Linnaeus, 1758 (MÜLLER, 1912; ELTRINGHAM, 1925, 1926; GILBERT, 1976). No gênero *Pieris*, os voláteis do antiafrodisíaco transferido para a fêmea, são responsáveis pela atração de *Tricograma* spp. que identifica a fêmea acasalada e a utiliza como transporte forético até o local da postura, onde parasita os ovos (HUIGENS *et al.*, 2010).

O antiafrodisíaco é transferido pelo macho para a fêmea, atuando como reforço à monandria (GILBERT, 1976; SCHULZ *et al.*, 2008; KLEIN & ARAÚJO, 2010). É produzido por glândulas (glândulas odoríferas abdominais) localizadas nas valvas ou cláspes do macho e transferidas durante a cópula para a parte externa do saco abdominal dorsal amarelo presente na fêmea virgem (ELTRINGHAM, 1925, 1926; OCKENFELS *et al.*, 1998; ROSS *et al.*, 2001; SCHULZ *et al.*, 2008) denominado também glândula odorífera abdominal por alguns autores e aqui denominada de bolsa ou saco odorífero abdominal. A transferência de antiafrodisíaco ocorre quando o macho prende o abdômen da fêmea com as valvas durante a cópula (OCKENFELS *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 2001). O saco odorífero abdominal da fêmea é extrudado através da abertura existente entre o sétimo e o oitavo tergitos, por pressão hemostática (OCKENFELS *et al.*, 1998; ROSS *et al.*, 2001; KLEIN & ARAÚJO, 2010). Quando a borboleta é capturada ou perturbada, infla o saco, exibindo um par de estruturas

laterais em forma de haste, que possivelmente distribuem os voláteis (SCHULZ *et al.*, 2008), denominadas de bastões odoríficos (MÜLLER, 1912; ELTRINGHAM, 1925, 1926).

### **Semioquímicos antiafrodisíacos**

Em Rophalocera, como exemplo, em Pieridae, os machos de *Pieris napi* Linnaeus, 1758, *Pieris rapae* Linnaeus, 1758 e *Pieris brassicae* Linnaeus, 1758, transferem espermatóforo com antiafrodisíaco à fêmea que inibe novos acasalamentos. Os voláteis são liberados quando a fêmea exhibe a atitude de “recusa ao macho” que consiste em abrir as asas horizontalmente e elevar o abdômen (ANDERSSON *et al.*, 2000; ANDERSSON *et al.*, 2003; ANDERSSON, 2004; SCHULZ *et al.*, 2008). O feromônio antiafrodisíaco de *P. napi* foi identificado como o éster fenólico salicilato de metila em ejaculados do macho. O antiafrodisíaco é emitido pela fêmea quando ela é cortejada por machos adicionais, dissuadindo-os de tentar acasalar com ela (ANDERSSON *et al.*, 2000). O macho ajusta seu ejaculado, através das pistas do antiafrodisíaco oriundo da fêmea acasalada, para melhorar suas chances de paternidade no âmbito da concorrência, aumentando a quantidade do ejaculado e/ou a quantidade de esperma transferido para uma fêmea na cópula (LARSDOTTER-MELLSTROM, 2016).

### **A composição química do antiafrodisíaco das Glândulas odoríferas abdominais em Nymphalidae**

A composição química do antiafrodisíaco é variável em Heliconiinae. Em *A. paphia* o macho transfere  $\alpha$ -farneseno e acetato de 1-dodecila (OCKENFELS *et al.*, 1998), em *H. melpomene*, o composto antiafrodisíacos (*E*)- $\beta$ -ocimeno é transferido às fêmeas (SCHULZ *et al.*, 2008), e em *A. vanillae*, o volátil 6-metil-5-hepten-2-ona é encontrado no macho e na fêmea após o acasalamento, onde sugere-se que evita a predação de aves (ROSS *et al.*, 2001).

Os compostos isopentanoato de hexila e salicilato de benzila, são compostos conhecidos por provocar a rejeição das fêmeas durante a corte de machos em *Heliconius cydno* Doubleday, 1847, e *Heliconius charithonia* Linnaeus, 1767, respectivamente (ESTRADA, 2009).

Foram descritos como compostos das glândulas odoríficas abdominais de dez espécies do gênero *Heliconius* (*H. cydno*, *Heliconius pachinus* Salvin, 1871, *Heliconius numata* (Cramer, 1780), *Heliconius charithonia* (Linnaeus, 1767), *Heliconius*

*hewitsoni* (Hewitson, 1875), *Heliconius hecale* (Fabricius, 1776), *Heliconius ismenius* Latreille, [1817], *H. erato* (Linnaeus, 1758), *Heliconius sapho* (Drury, 1782) e *Heliconius sara* (Fabricius, 1793)), uma mistura química que inclui ésteres (41%), lactonas (26%), e terpenos (15%), sendo o restante, alcoóis, cetonas, e compostos aromáticos (Estrada *et al.* 2011). Os compostos foram divididos em grandes compostos voláteis e uma complexa matriz de ésteres (OCKENFELS *et al.*, 1998; ROSS *et al.*, 2001; SCHULZ *et al.*, 2008; ESTRADA, 2009).

Macrolídeos foram os compostos principais encontrados nos voláteis de *H. cydno* e *H. pachinus* (SCHULZ *et al.*, 2007), para esta última (*R*)-(Z,E)-9,11-octadecadieno-13-olida foi encontrada em machos e fêmeas maduros, mas não em jovens adultos e pupas (MIYAKADO *et al.*, 1989). Os voláteis, em *H. melpomene*, teriam por função repelir os machos enquanto que a matriz presume-se, regularia a evaporação dos voláteis durante a exposição da glândula da fêmea (SCHULZ *et al.*, 2007, 2008). O (*E*)- $\beta$ -ocimeno, antiafrodisíaco de *H. melpomene* está presente, embora em quantidades mais baixas, na maioria das outras borboletas *Heliconius* estudadas até agora (SCHULZ *et al.*, 2008; ESTRADA, 2009; ESTRADA *et al.*, 2011). Borges *et al.* (2017) apresentaram um estudo no qual o (*E*)- $\beta$ -ocimeno é um dos voláteis constituintes de *Passiflora edulis* Sims 1818, que serviu de planta hospedeira para larvas de *H. erato phyllis*, e que provavelmente é um composto capturado pelas larvas e utilizado pelas borboletas macho como constituinte de seu antiafrodisíaco.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Investigar a composição química dos voláteis, morfologia e etologia relacionados às glândulas odoríferas abdominais de *Heliconius erato phyllis*, *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei*.

### 1.2.2 Os objetivos específicos

Coletar, extrair e identificar glândulas e feromônios relacionados aos lepidópteros.

Realizar análise qualitativa pelos índices de retenção e índice de Kovats e importância biológica.

Realizar análise quantitativa dos compostos presentes na glândula odorífera abdominal do macho e na bolsa odorífera abdominal da fêmea.

Determinar a morfologia dos órgãos e glândulas envolvidas na produção dos voláteis em *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei* e compará-los com os resultados já obtidos para *Heliconius erato phyllis*.

Testar os compostos bioativos identificados através de bioensaios e eletroantenografia.

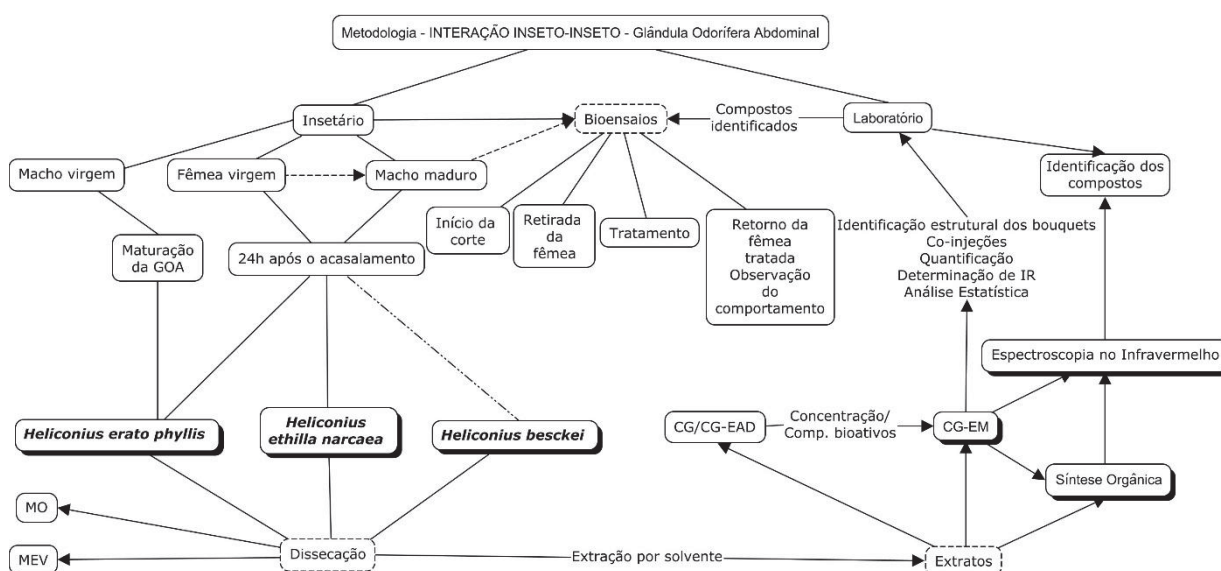
## 2 METODOLOGIA

No insetário citado no capítulo I, após a coleta e adaptação de fêmeas para a postura de ovos, obtenção das larvas, e de adultos virgens, iniciaram-se os procedimentos para realização dos acasalamentos, dissecação das glândulas odoríferas abdominais; preparação dos extratos; as análises químicas e morfológicas de *Heliconius erato phyllis*, *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei*. Em área de reprodução, dentro do insetário, foram realizados os acasalamentos. Não foram realizados acasalamentos de *H. besckei*.

Análises sobre a maturação das glândulas odoríferas abdominais do macho, análises eletroantegráficas e bioensaios foram realizados somente para a espécie *H. erato phyllis*.

A metodologia aqui relatada encontra-se abaixo, no resumo esquemático (FIGURA 43), onde as linhas tracejadas correspondem a etapas parcialmente concluídas, e as linhas tracejadas e duplamente pontilhadas correspondem a etapas não realizadas.

FIGURA 43 - RESUMO ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DAS GLÂNDULAS ODORÍFICAS ABDOMINAIS DE *H. erato phyllis*, *H. ethilla narcaea* E *H. besckei*



FONTE: O autor (2011).

### 2.1 CRIAÇÃO DE *Heliconius erato phyllis*, *Heliconius ethilla narcaea* E *Heliconius besckei* E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

Objetivo: Obter amostras dos espécimes mantidos em insetário.

Os adultos foram capturados na mata nativa do Centro Politécnico (CP) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Parque Barigüi e Parque Barreirinha, Curitiba, Paraná, Brasil.

Para a criação e manejo de adultos, utilizou-se um insetário como ambiente de condições seminaturais para a manutenção de adultos e oviposição, revestida com uma tela de sombreamento que permitia a passagem de 30% da luz direta do sol. No interior, havia vasos com *Passiflora edulis* Sims, 1818, *Passiflora actinia* Hooker, 1943, *Impatiens walleriana* Hook, *Lantana camara* Linnaeus, 1753, e recipientes para com dieta artificial, de acordo com Borges *et al.* (2010). Ovos, larvas e pupas foram mantidos em sala de criação do insetário. Dentro do insetário foi construída uma área de reprodução, com 2m de altura, 1m de largura e 1m de comprimento. Os acasalamentos foram obtidos colocando-se um macho recém-coletado do campo em contato com cinco fêmeas virgens em média. Para análise de maturação do macho, os machos recém-emergidos foram isolados.

O acasalamento com machos virgens não foi possível em cativeiro, apesar do cuidado despendido aos tempos de maturação e para aprendizado.

## 2.2. ANÁLISE MORFOLÓGICA

Objetivo: Analisar a morfologia externa das estruturas envolvidas.

As valvas e bolsa odorífera abdominal foram dissecadas e analisadas através de micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV), equipamentos JEOL JSM 6360-LV e TESCAN VEGA3 LMU, seguindo os procedimentos padrão de Kaminski *et al.* (2008) e Leite *et al.* (2010).

## 2.3 COLETA DAS AMOSTRAS

Objetivo: Obtenção de extratos das amostras coletadas.

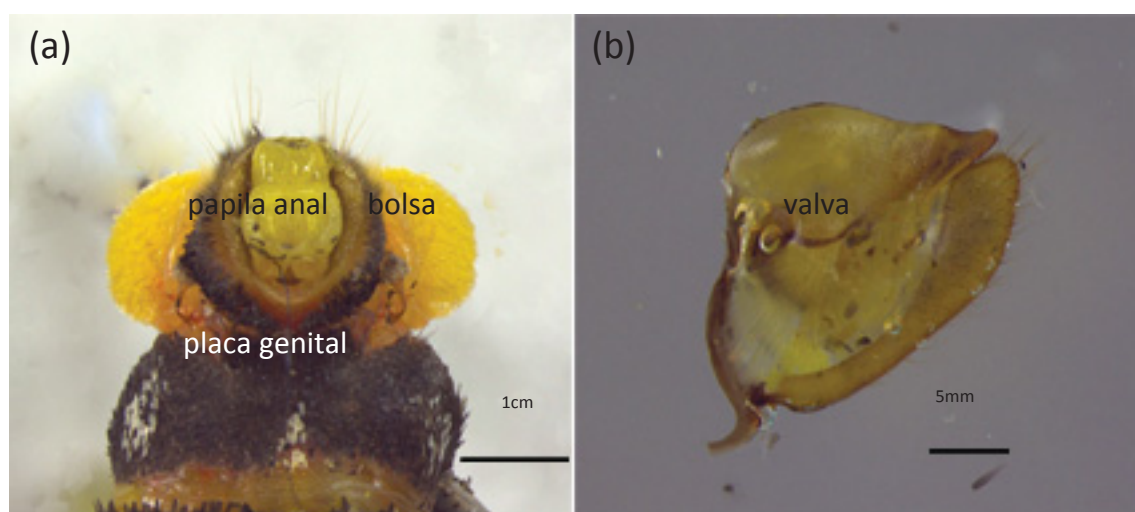
Foram dissecadas valvas de trinta machos, uma unidade correspondendo a duas valvas para cada espécime (FIGURAS 44 e 45). Cada valva era cortada em sua base. As valvas de machos virgens foram dissecadas após um, dois, três e quatro depois da emergência. As valvas do macho e o saco da fêmea foram dissecados 24 horas após o acasalamento.

Foi dissecado o saco odorífero abdominal de trinta fêmeas, uma unidade correspondendo a uma bolsa por espécime. Cada bolsa era cortada excluindo-se a papila anal e a placa genital, e mantidos os bastões odoríferos. As valvas e saco



odorífero abdominal foram dissecados sob microscópio estereoscópico Quimis®. Cada estrutura dissecada foi imersa, separadamente, em 50 µl de hexano por 24 h, em frasco de 1,5 ml. Foi adicionado ao extrato final um padrão interno (PI) de tetradecano, 100ppm a 5µL /extrato (Zarbin *et al.*, 1999). O extrato foi quantificado com base na área do pico PI.

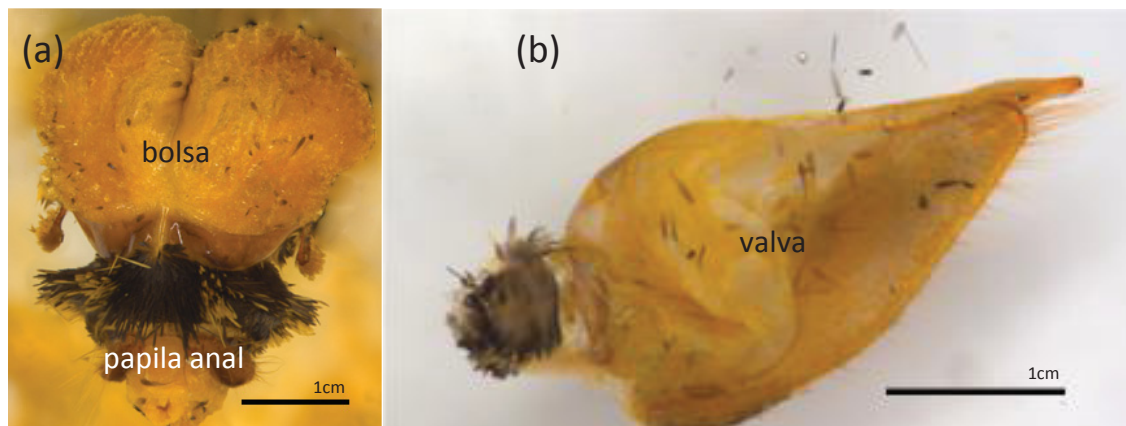
FIGURA 44 – (a), BOLSA ODORÍFERA ABDOMINAL DA FÊMEA. (b), VALVA DO MACHO DE *Heliconius erato phyllis*



FONTE: O autor (2016).



FIGURA 45 – (a), BOLSA ODORÍFERA ABDOMINAL DA FÊMEA (VISTA DORSAL). (b), VALVA DO MACHO DE *Heliconius ethilla narcaea*



FONTE: O autor (2016).

## 2.4 PROCEDIMENTOS QUÍMICOS

Objetivo: Analisar os compostos presentes nos *bouquets* odoríferos.

Os extratos foram analisados por cromatografia em fase gasosa e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) em equipamento Shimadzu QP 2010 Plus. O GC e o GC-EM foram equipados com uma coluna RTX-5 (30m × 0,25mm d.i. 0,25mm de espessura do filme, Restek, Bellefonte, PA, EUA). Injeções de 1 µL foram realizadas no modo splitless, com uma temperatura do injetor de 250 °C. A temperatura do forno da coluna foi mantida a 40 °C durante 1 min, aumentada para 250 °C a 7 °C.min<sup>-1</sup> e mantida durante 15 min. O hélio foi o gás transportador a uma velocidade linear de 36,3 cm.s<sup>-1</sup>. Os mesmos parâmetros foram utilizados para todas as análises.

O saco odorífero abdominal da fêmea e a glândula odorífera abdominal da valva do macho, foram denominadas de glândula odorífera abdominal para facilitar a identificação em tabelas e gráficos.

## 2.5 ANÁLISES ELETROANTENOGRÁFICAS

Objetivo: Analisar a bioatividade dos compostos presentes nos *bouquets* odoríferos.

Os extratos de glândulas do macho, na concentração de 1 unidade em 50µL de hexano, foram analisados por um sistema de cromatografia em fase gasosa

acoplada a detector eletroantegráfico (GC-EAD) (ZARBIN *et al.*, 1999). Os dados gerados foram processados usando o programa Syntech GC-EAD32 (versão 4.6).

## 2.6 SÍNTESE E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIAFRODISÍACOS

Objetivo: Identificar os compostos presentes nos *bouquets* odoríferos.

Os compostos foram identificados por índices de Kovats (IK), comparações de espectro de massas, por coinjeções com padrões comercialmente disponíveis e espectroscopia de infravermelho. O composto (*E*)-3,7,11-trimetiloxacicoundec-7-en-2-ona foi identificado através da realização de reações de derivatização (Melo *et al.*, dados não publicados).

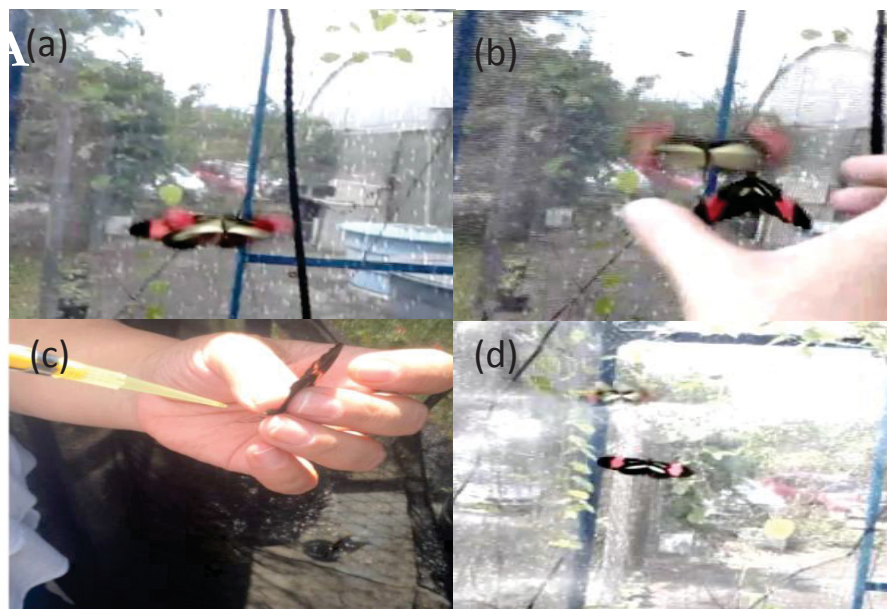
## 2.7 BIOENSAIOS COMPORTAMENTAIS

Objetivo: Analisar o comportamento associado aos possíveis compostos bioativos.

Os bioensaios testaram a ação do buquê e dos compostos individuais sobre o comportamento da fêmea virgem e machos maduros. Foram realizados dez bioensaios para cada composto e buquê testado. Para obtenção da concentração do extrato sintético foram utilizados cálculos e comparações de área entre o composto sintético e os extratos da fêmea acasalada.

Os bioensaios foram realizados em uma área isolada do insetário (área de reprodução) provida de vasos com mudas de *P. edulis*, dieta artificial e flores (*I. waleriana*). Todos os cuidados higiênicos do manipulador de espécimes, para não contaminação, foram tomados. Uma fêmea virgem foi colocada no ambiente com dois machos ativos. Após a observação do início da corte (vibração das asas do macho sobre a fêmea), a fêmea foi removida, seu abdome levemente pressionado e sua bolsa odorífera abdominal tratada com 10µL de cada solução de tratamento. O buquê da glândula odorífera abdominal (1143,10ng/µL), hexano (solvente dos extratos), 2,6,10-trimetiloxacicoundec-6-enona (4,5ng/µL) e (*E*)-β-ocimeno (469,45ng/µL) foram aplicados e depois de 30 segundos a fêmea foi colocada novamente na área de reprodução com os dois machos, para observação dos comportamentos; com um tempo máximo que variou de 4 a 6 minutos (FIGURA 46).

FIGURA 46 - ETAPAS DOS BIONSAIOS: (a) INÍCIO DA CORTE. (b) RETIRADA DA FÊMEA. (c) TRATAMENTO DA FÊMEA. (d) RECOLOCAÇÃO DA FÊMEA NA ÁREA DE REPRODUÇÃO PARA OBSERVAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS



FONTE: O autor (2017).

Os comportamentos foram analisados com base em Klein & Araújo (2010). Todos os bioensaios foram filmados. Os experimentos foram filmados em câmera de vídeo de celular marca LG K10.

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Objetivo: Analisar estatisticamente os resultados obtidos nos experimentos.

A quantidade média de compostos bioativos e compostos totais das valvas e sacos odoríferos abdominais em machos e fêmeas acasalados, machos de campo, machos e fêmeas virgens, e dos bioensaios foram analisadas estatisticamente. Em cada análise quantitativa foram utilizados quatro espécimes para cada sexo. Nos acasalamentos foram utilizados machos de campo e fêmeas virgens recém-emergidas. Os resultados da quantificação dos compostos foram testados por ANOVA, seguido pelo teste de Tukey e análise de PCA. Nas análises das respostas nos bioensaios foi utilizado o teste qui-quadrado.

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa R versão 3.3.2 (R Development Core Team 2016). Os gráficos foram realizados no Excel ® e OriginPro8 ®, o cálculo do erro padrão foi realizado no Excel ®.

### 3 RESULTADOS

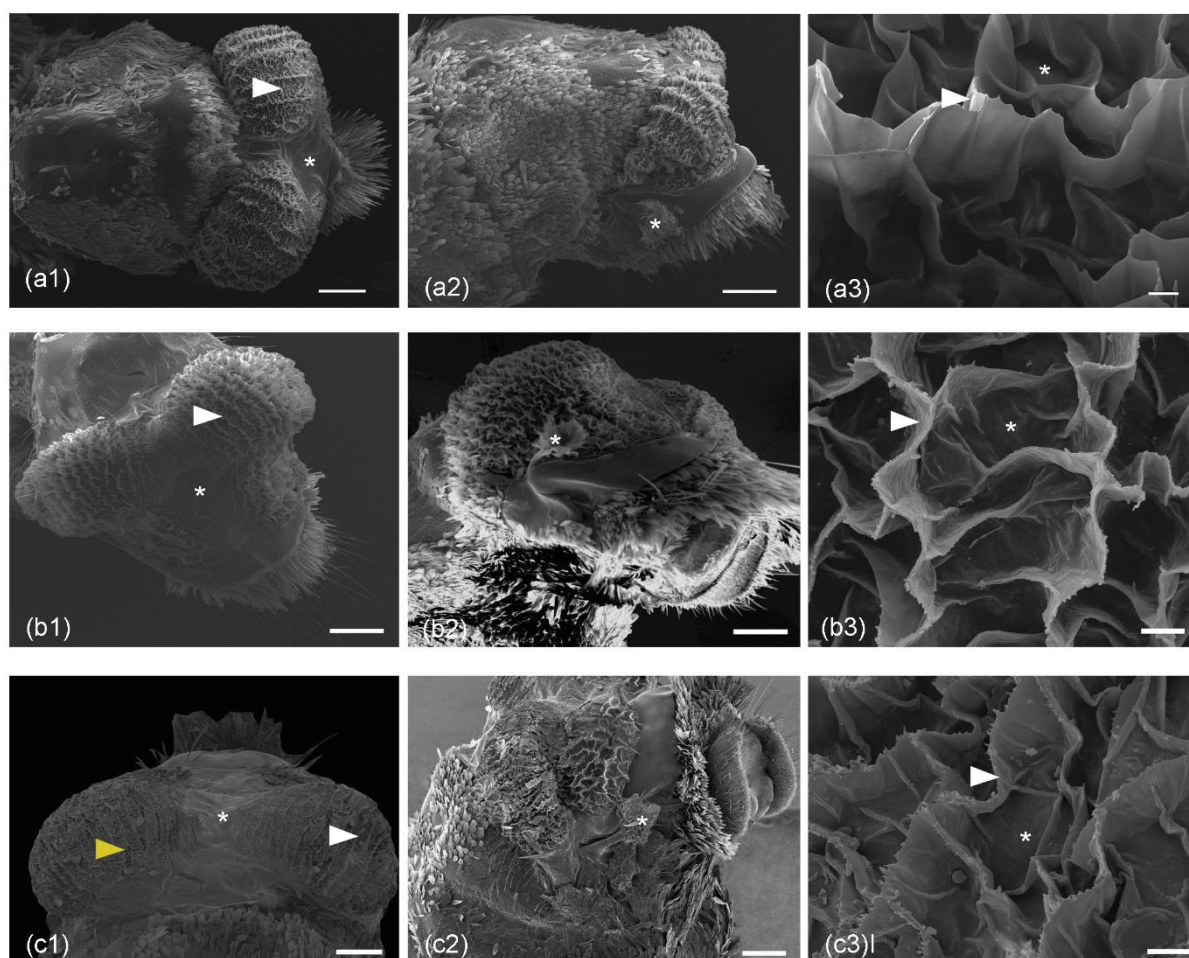
#### 3.1. MORFOLOGIA

##### 3.1.1. Fêmea

##### 3.1.1.1 Saco odorífero abdominal

O saco odorífero abdominal da fêmea (FIGURA 47 – a1, b1, c1) é localizada na região dorsal sob o sétimo segmento e é composta por um tegumento muito delicado, que pode ser projetado sempre que o abdômen é comprimido. A análise morfológica mostra que o saco é amarelo ou alaranjado, ligeiramente bilobado. Os dois lobos são separados por uma área de superfície esclerotizada [FIGURA 47 – a1, b1, c1 (asterisco)] e os lados têm um processo externo como haste, os bastões odoríferos [FIGURA 47 a2, b2, c2 (asterisco)], com uma extremidade em forma de leque, coberta com cerdas. A superfície dos lobos da bolsa ou saco tem projeções translúcidas [FIGURA 47 – a3, b3, c3 (ponta de seta branca)]. Uma análise por microscopia eletrônica de varredura mostra que as projeções translúcidas da superfície da bolsa feminina formam um labirinto de paredes horizontais translúcidas irregulares que delimitam cisternas ou tanques [FIGURA 47 – a3, b3, c3 (asterisco)]. As cisternas ou tanques recebem e armazenam a secreção antiafrodisiaca. Os voláteis são emitidos quando a bolsa feminina é exposta em comportamentos de acasalamento e defesa. A parte exposta da bolsa feminina pela pressão interna hidrostática infla como um paraquedas movido a ar.

FIGURA 47 – MICROGRAFIAS (MEV) DA BOLSA ODORÍFERA ABDOMINAL DA FÊMEA FORMADA POR DOIS LOBOS SEPARADOS POR ÁREA DE SUPERFÍCIE QUERATINIZADA (ASTERISCO) (a1, b1 e c1) COM TANQUE VAZIO (SETA BRANCA) E CISTERNA CHEIA DE FEROMÔNIO (SETA AMARELA); OS BASTÕES ODORÍFEROS (ASTERISCO) NAS LATERAIS DA BOLSA (a2, b2 e c2) E DETALHES DA SUPERFÍCIE SUPERIOR DO LOBO MOSTRANDO AS PAREDES HORIZONTAIS TRANSLÚCIDAS (SETA BRANCA) E CISTERNAS (ASTERISCO) (a3, b3 e c3) DE *H. erato phyllis* (a1, a2, c2), BARRAS = 500  $\mu$ m, 500  $\mu$ m E 10  $\mu$ m, *Heliconius ethilla narcaea* (b1, b2, b3), BARRAS = 500  $\mu$ m, 500  $\mu$ m E 20  $\mu$ m E *Heliconius besckei* (c1, c2, c3), BARRAS = 500  $\mu$ m, 500  $\mu$ m e 20  $\mu$ m, RESPECTIVAMENTE



FONTE: O autor (2018).

### 3.1.1.2 Cisternas ou tanques

O arranjo das projeções translúcidas é diferente nos lepidópteros em estudo. *Heliconius erato phyllis* apresentam cisternas menores e mais numerosas (FIGURA 47 – a1) para o armazenamento de feromônio antiafrodisíaco na superfície superior dos lobos. Em *Heliconius ethilla narcaea* (Fig. FIGURA 47 - b1) e *Heliconius besckei*



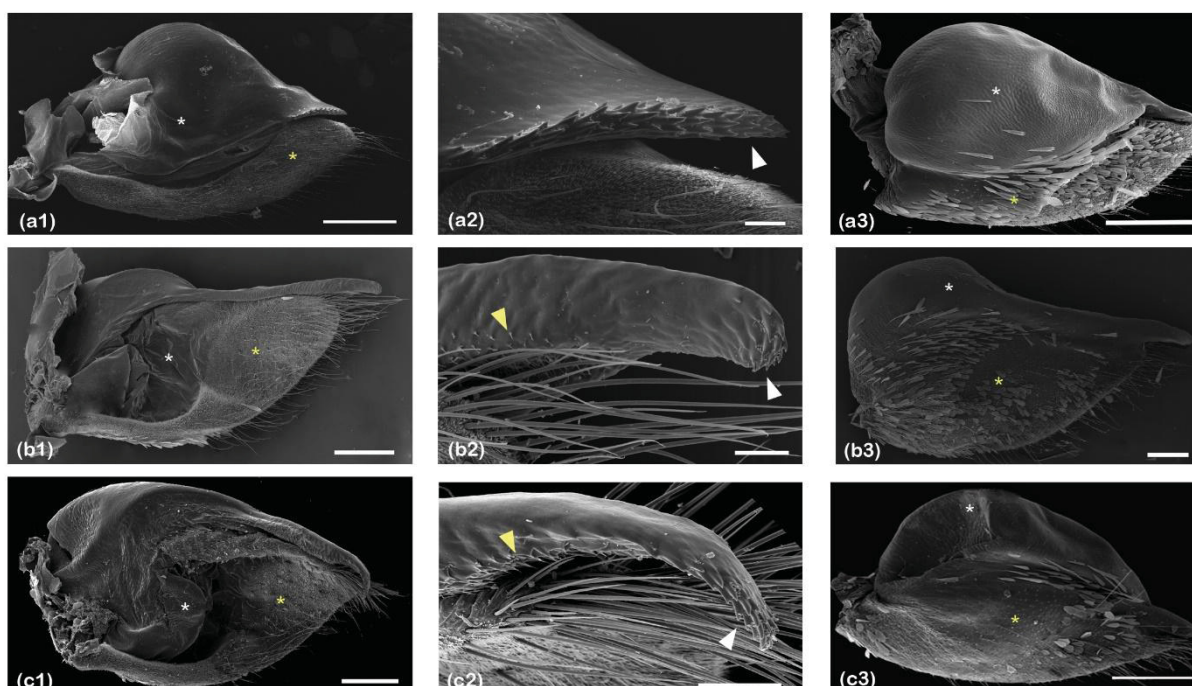
(FIGURA 47 – c1), o tamanho dessas cisternas é maior e similar. Nas imagens obtidas das cisternas com feromônio [FIGURA 47 – c1 (ponta de seta preta)], pode-se observar que a secreção ali depositada pode preencher completamente o espaço interno do tanque e aparece depositada também nas cerdas dos bastões odoríferos [FIGURA 47 – c2 (asterisco)]. Nas paredes das cisternas dos lepidópteros há pequenas saliências irregulares com uma forma ligeiramente triangular [FIGURA 47 – a3, b3, c3 (ponta de seta branca)]. Estima-se o diâmetro das menores cisternas de *H. erato phyllis* com aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ , e de *H. ethilla narcaea* e *H. besckei* com aproximadamente 60  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.2 Macho

#### 3.1.2.1 Valva do macho

A glândula odorífera abdominal corresponde a uma bolsa em forma de harpa cheia de secreção na superfície interna da valva (FIGURA 48 - a1, b1, c1). Nesta superfície, duas áreas são distintas, uma superior com tecido fino e delicado e com grande parte da área glandular [FIGURA 48 – a1, b1, c1 (asterisco branco)], e outra inferior [FIGURA 48 – a1, b1, c1 (asterisco preto)], com cerdas longas e pequenas. Externamente, a valva também apresenta duas áreas, uma superior [FIGURA 48 – a3, b3, c3 (asterisco branco)], com poucas escamas, e uma área inferior [FIGURA 48 – a3, b3, c3 (asterisco branco)], com pequenas escamas e cerdas longas. Na extremidade afilada da superfície interna da válvula masculina estão localizados dentículos [FIGURA 48 – a2, b2, c2 (ponta de seta branca)].

FIGURA 48 – MICROGRAFIAS (MEV) DA VALVA DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL DO MACHO (a1, b1 e c1) COM ÁREA SUPERIOR (ASTERISCO BRANCO) E ÁREA INFERIOR (ASTERISCO AMARELO), DETALHE DA EXTREMIDADE CÔNICA DA FACE INTERNA QUERATINIZADA DA VALVA COM DENTÍCULOS (a2, b2 e c2) COM DENTÍCULOS PROEMINENTES (SETA BRANCA) E CERDAS PEQUENAS (SETA AMARELA) E SUPERFÍCIE EXTERNA DA VALVA (a3, b3, c3), COM ÁREA SUPERIOR (ASTERISCO BRANCO) E ÁREA INFERIOR (ASTERISCO AMARELO) DE *Heliconius erato phyllis* (a1, a2 e a3), BARRAS = 500µm , 50 µm e 500 µm, *Heliconius ethilla narcaea* (b1, b2 e b3), BARRAS = 500 µm, 50 µm e 500 µm, *Heliconius besckei* (c1, c2 e c3), BARRAS = 500 µm, 100 µm E 500 µm, RESPECTIVAMENTE



FONTE: O autor (2018).

### 3.1.2.2 Extremidade afilada da superfície interna da valva

A valva do macho *Heliconius erato phyllis* mostra os denticulos dispostos em três unidades juntas, aproximadamente vinte conjuntos inicialmente acoplados estão localizados e bastante pontiagudos [FIGURA 48 – a2 (ponta de seta branca)]. Em *H. ethilla narcaea* existem, em média, oito denticulos na extremidade afilada da valva masculina [FIGURA 48 – b2 (ponta de seta branca)], pouco proeminentes; e cerdas pequenas [FIGURA 48 – b2 (ponta de seta preta)]. *Heliconius besckei* apresenta a extremidade afilada da valva em forma de foice com aproximadamente 30 denticulos maiores e mais proeminentes [FIGURA 48 – c2 (ponta de seta branca)] e uma cobertura de pequenos denticulos [FIGURA 48 – c2 (ponta de seta preta)] no restante



da estrutura. Em *H. ethilla narcaea* e *H. besckei* os denticulos não são pontiagudos, sendo mais proeminentes ao final da estrutura [FIGURA 48 – b2, c2 (ponta de seta branca)].

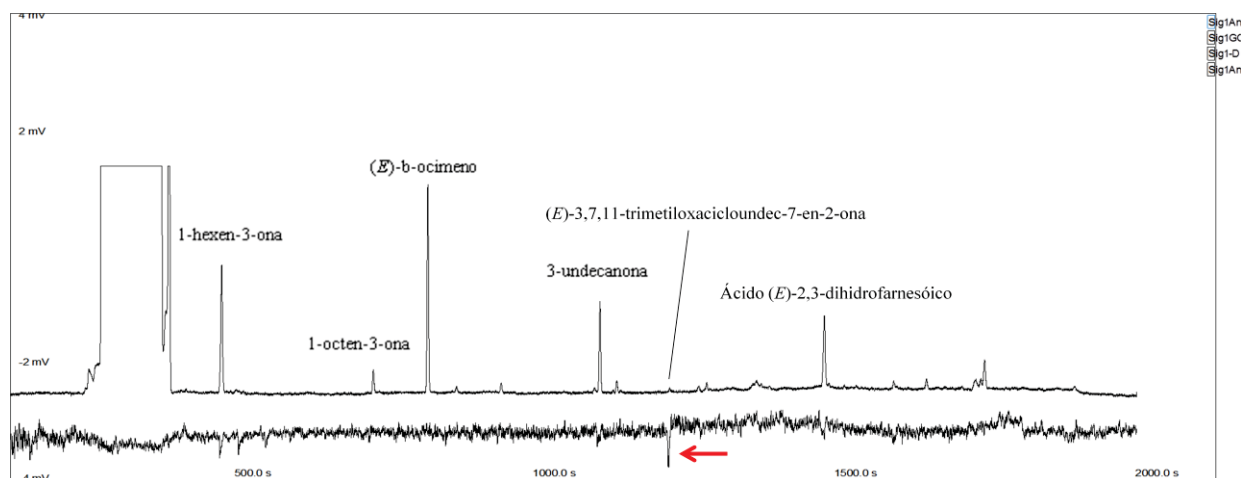
## 3.2 ANÁLISES QUÍMICAS

### 3.2.1. Análise qualitativa inicial

Em *H. erato phyllis* e *H. ethilla narcaea* não foram detectadas diferenças qualitativas entre as categorias (macho não acasalado, macho acasalado e fêmea acasalada).

Seis compostos bioativos foram identificados em análises eletroantegráficas (FIGURA 49), quantificados e identificados nos extratos de machos não acasalados, machos acasalados e fêmeas acasaladas de *Heliconius erato phyllis* (QUADRO 2).

FIGURA 49 – ELETROANTENOGRAMA COM RESPOSTAS DA ANTENA DA FÊMEA VIRGEM AO EXTRATO DAS GLÂNDULAS ODORÍFERAS ABDOMINAIS DO MACHO ACASALADO DE *Heliconius erato phyllis*. (SETA VERMELHA), A RESPOSTA DE MAIOR INTENSIDADE



FONTE: O autor (2015)

QUADRO 2 - FÓRMULAS ESTRUTURAIS DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Heliconius erato phyllis*

Nº	Fórmula estrutural	Nome do composto
1	<chem>C=CC(=O)CC</chem>	1-hexen-3-ona
2	<chem>C=CC(=O)CCCCC</chem>	1-octen-3-ona
3	<chem>CC(=C)C=CC=C(C)C</chem>	(E)-β-ocimeno
4	<chem>CCCCCCCC(=O)CC</chem>	3-undecanona
5	<chem>CC1=CC(=O)OCC1C</chem>	(E)-3,7,11-trimetiloxaciloundec-7-en-2-ona
6	<chem>CC(=C)CC=CC(C)CC(=O)O</chem>	ácido (E)-2,3-dihidrofarnesóico

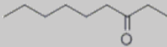


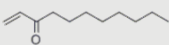
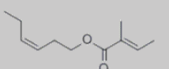
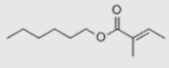
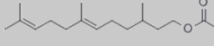
FONTE: Me. Douglas José Melo e o autor (2018).

Oito compostos foram quantificados e identificados nos extratos de machos não acasalados, machos acasalados e fêmeas acasaladas de *Heliconius ethilla narcaea*. Oito compostos foram identificados nos extratos de machos não acasalados de *Heliconius besckei*. Em *H. besckei*, não foi possível a realização de acasalamentos controlados.

As análises em CG-EM da glândula odorífera abdominal dos lepidópteros mostraram que possuem em comum o composto (E)- $\beta$ -ocimeno.

Em *Heliconius erato phyllis* além dos seis (6) compostos bioativos identificados, sete (7) compostos não bioativos foram parcialmente identificados (QUADRO 3).

QUADRO 3 - FÓRMULAS ESTRUTURAIS DE COMPOSTOS NÃO BIOATIVOS PARCIALMENTE IDENTIFICADOS DE *Heliconius erato phyllis*

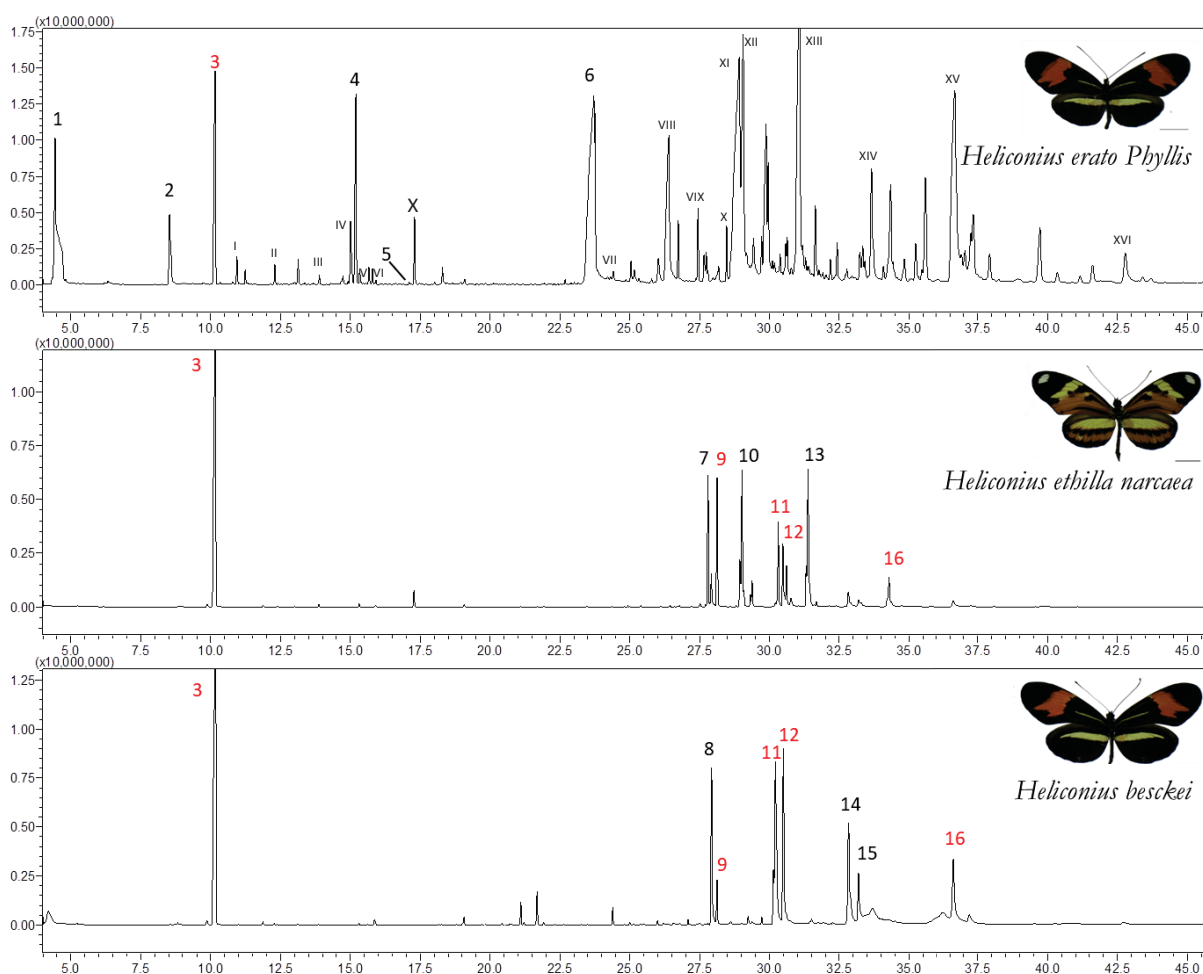
Nº	Fórmula estrutural	Nome do composto
I		nonan-3-ona
II		2-fenilacetnitrila
III		2,6,6-trimetilciclohex-1-enocarbaldeído
IV		undec-1-em-3-ona
V		(E)-2-metil but-2-enoato de (Z)-hex-3-em-1-ila
VI		(E)-2-metil but-2-enoato de hexila
VII		acetato de (E)-3,7,11-trimetilododeca-6,10-dien-1-ila

FONTE: Me. Douglas José Melo e o autor (2018).

E outros sete (7) compostos não bioativos tiveram somente a função química identificada e dois (2) são dúvidas, de um total de vinte e dois (22) compostos.

Em *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei* foram identificados oito (8) compostos, dos quais cinco (5) são compostos comuns (FIGURA 50).

FIGURA 50 - COMPARAÇÃO ENTRE CROMATOGRAMAS COM OS COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS DAS VALVAS DOS MACHOS DE *Heliconius erato phyllis* [BIOATIVOS (NUMERO ARÁBICO) E PARCIALMENTE IDENTIFICADOS (NÚMERO ROMANO)], *Heliconius ethilla narcaea* E *Heliconius besckei* (COMPOSTOS TOTAIS). OS NÚMEROS EM VERMELHO SÃO COMPOSTOS COMUNS AOS LEPIDÓPTEROS. (X), PADRÃO INTERNO (TETRADECANO, 100ppm A 5µL/EXTRATO)



FONTE: O autor (2018).

### 3.2.2. Análise qualitativa pelo índice de retenção (Kovats)

Os compostos foram identificados nos *bouquets* das valvas dos lepidópteros (TABELA 4) que mostram qualitativamente a presença de compostos contendo as funções: Ácido carboxílico, álcool, hidrocarboneto, éster e aldeído. Dentre os compostos o (*E*)- $\beta$ -ocimeno é encontrado na valva do macho e bolsa odorífera abdominal da fêmea dos três lepidópteros. *Heliconius erato phyllis* possui vinte e dois compostos, dentre estes compostos, seis (6) são bioativos e dezesseis não bioativos, que foram parcialmente ou não identificados. *Heliconius ethilla narcaea* e *H. besckei*

possuem os compostos eneicosano, (11Z)-eicos-11-enol, (9Z)-tricos-9-ano e docosanol, em comum.

TABELA 4 - COMPARAÇÃO ENTRE OS COMPOSTOS ENCONTRADOS NAS GLÂNDULAS ODORÍFERAS ABDOMINAIS DE *Heliconius erato phyllis* [BIOATIVOS (NÚMERO ARÁBICO) E PARCIALMENTE IDENTIFICADOS (NÚMERO ROMANO)], *Heliconius ethilla narcaea* E *Heliconius besckei*

Nº	Tempo de Retenção	IR calc	Composto	IR lit	<i>Heliconius erato phyllis</i>	<i>Heliconius ethilla narcaea</i>	<i>Heliconius besckei</i>
1	4.853	776	1-hexen-3-ona	775			
2	9.994	971	1-octen-3-ona	973			
3	10,169	1050	(E)- $\beta$ -ocimeno	1050			
I	-	-	nonan-3-ona	-			
II	-	-	2-fenilacetona	-			
III	-	-	2,6,6-trimetilciclohex-1-enocarbaldeído	-			
IV	-	-	undec-1-em-3-ona	-			
4	16.602.5	1588	3-undecanona	1586			
V	-	-	(E)-2-metil but-2-enoato de (Z)-hex-3-em-1-ila	-			
VI	-	-	(E)-2-metil but-2-enoato de hexila	-			
5	18.944.5	1467	(E)-3,7,11-trimetiloxacicoundec-7-en-2-ona	X			
6	24.481	1750	ácido (E)-2,3-dihidrofarnesóico	X			
VII	-	-	acetato de (E)-3,7,11-trimetil deca-6,10-dien-1-ila	-			
VIII	-	-	-	-			
IX	-	-	-	-			
X	-	-	-	-			
XI	-	-	-	-			
XII	-	-	-	-			
XIII	-	-	-	-			
XIV	-	-	-	-			
XV	-	-	-	-			
XVI	-	-	-	-			
7	27,75	2070	(Z)-heneicos-9-eno	2070			
8	27,257	2087	octadecanol	2088			
9	28,399	2100	heneicosano	2100			
10	29,975	2164	(Z)-octadec-9-enoato de etila	2171			
11	30,386	2250	(11Z)-eicos-11-enol	2250			
12	30,951	2300	(9Z)-tricos-9-ano	2299			
13	31,35	2355	(Z)-octadec-9-enoato de butila	X			
14	32,403	2400	tetracosano	2400			
15	33,643	2400	(13Z)-docos-13-enal	2401			
16	36,087	2480	docosanol	2475			

Compostos bioativos e parcialmente identificados no bouquet das glândulas odoríferas abdominais de *Heliconius erato phyllis*, e compostos identificados no bouquet de *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei*. (X) = índice de retenção não encontrado na literatura. (-) = Item não verificado.

FONTE: Prof. Dr. Stefan Schulz, Prof. Dr. Diogo Montes Vidal, Me. Douglas José de Melo e o autor (2017).

### 3.2.2.1 Importância biológica

Os compostos identificados foram abaixo separados de acordo com a sua ocorrência como feromônio, alomônios, atrativo, cairomônios e sinomônios em animais [vertebrados (V) e invertebrados (I)] e plantas, de acordo com a base de dados de feromônios El-Sayed (2018)].

1. 1-hexen-3-ona: (I) Insecta: Feromônio em Himenóptera. (V) Mamíferos e Anfíbios: Feromônio.
2. 1-octen-3-ona: (I) Insetos: Feromônio e cairomônio em Himenóptera, cairomônio em Coleoptera.
3. (*E*)- $\beta$ -ocimeno: (I) Arachnida: Alomônio e cairomônio, Insecta: Atrativo em Neuroptera, Cairomônio em Lepidoptera (família Chrysopidae), feromônio, atrativo e alomônio em Lepidoptera [família Pieridae, Papilionidae, Nymphalidae (gênero *Heliconius* sp.), Danaidae], feromônio, cairomônio e atrativo em Himenóptera, Diptera, Coleoptera, atrativo e feromônio em Heteroptera. E em plantas: Malpighiales, família Salicaceae.
4. 3-undecanona: (I) Insecta: Feromônio em Himenóptera (V) Mamíferos: Feromônio.
5. (*E*)-3,7,11-trimetiloxacicoundec-7-en-2-ona: Não foram encontrados registros.
6. Ácido (*E*)-2 3-dihidrofarnesóico: (I) Insecta: Feromônio em Himenóptera.
7. (*Z*)-heneicos-9-eno: (I) Insecta: Feromônio em Himenóptera, Diptera e Lepidoptera [família Tortricidae, Nymphalidae (gênero *Heliconius* spp.), Erebidae]. (V) Aves: Alomônio.
8. Octadecanol: Não foram encontrados registros.
9. Heneicosano: (I) Arachnida: Feromônio, Insecta: Feromônio em Trichoptera, Dictyoptera, Homóptera, Psocoptera, Heteroptera, Orthoptera, Lepidoptera [famílias Tortricidae, Pieridae, Nymphalidae (gêneros *Heliconius* spp.), Lymantriidae, Hesperiiidae, Danaidae, Castniidae], Isoptera; feromônio e atrativo em Himenóptera, Diptera, Coleoptera, (V) Répteis: Feromônio, Aves: Alomônio.

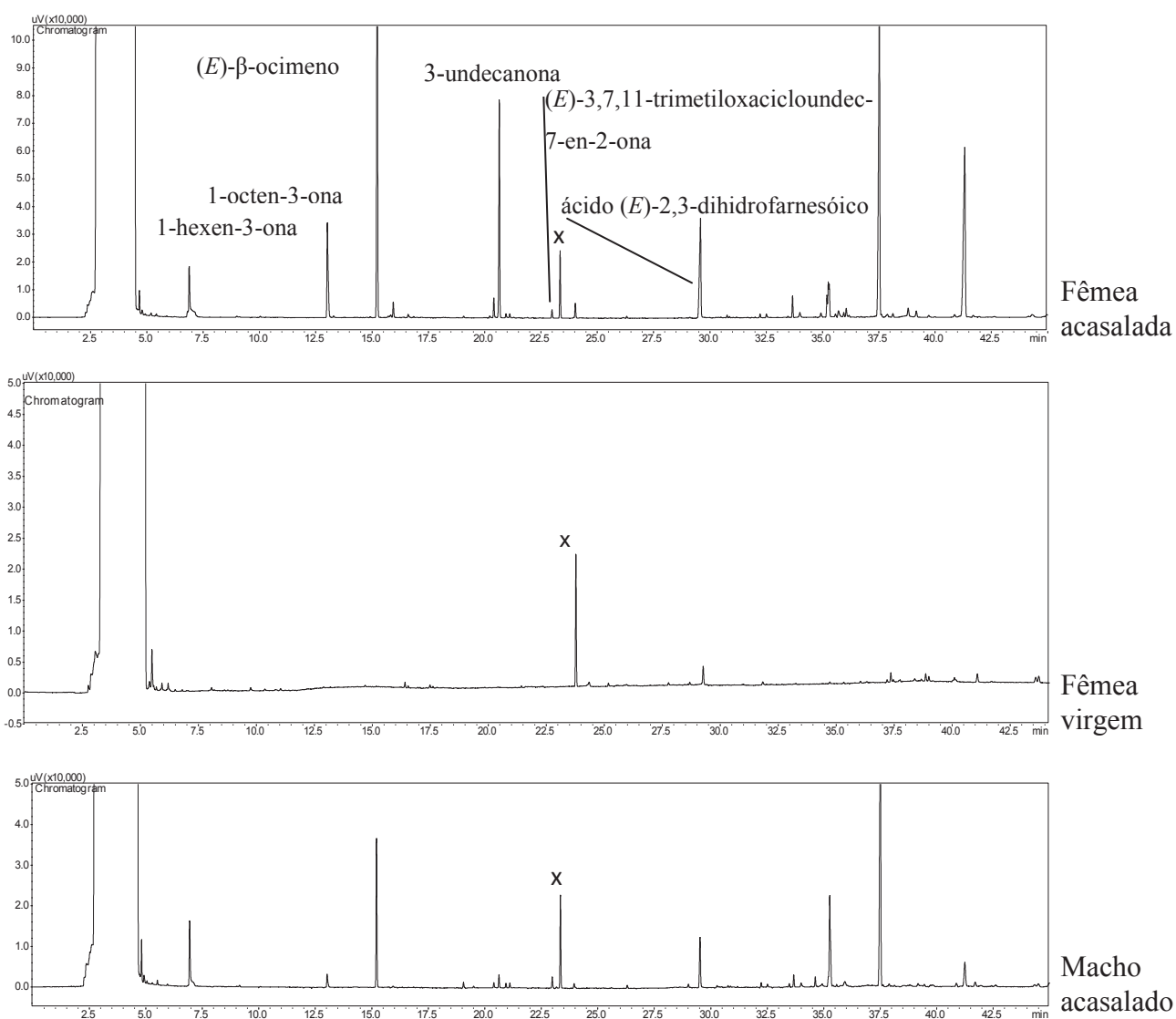
10. (Z)-octadec-9-enoato de etila: Não foram encontrados registros.
- 11.(11Z)-eicos-11-enol: (I) Feromônio em Himenóptera.
- 12.(9Z)-tricos-9-ano: Não foram encontrados registros.
- 13.(Z)-octadec-9-enoato de butila: Não foram encontrados registros.
- 14.Tetracosano: (I) Arachnida: Feromônio, Insecta: Feromônio em Trichoptera, Homóptera, Psocoptera, Coleoptera, Heteroptera, Isoptera, Orthoptera, Lepidoptera [família Pieridae, Nymphalidae (gênero Heliconius sp.), Crambidae, Danaidae, Noctuidae, Lymantriidae, Lycaenidae, Castniidae], cairomônios e feromônio em Himenóptera, atrativo e feromônio em Diptera, alomônios e feromônio em Isoptera, (V) Répteis: Feromônio, Aves: Alomônio.
- 15.(13Z)-docos-13-enal: (I) Insecta: Feromônio em Lepidoptera [família Nymphalidae (gênero Heliconius spp.)].
- 16.Docosan-1-ol: (I) Insecta: Feromônio em Himenóptera e Heteroptera. (V) Répteis, Mamíferos: Feromônio.



### 3.2.3 Análise quantitativa inicial

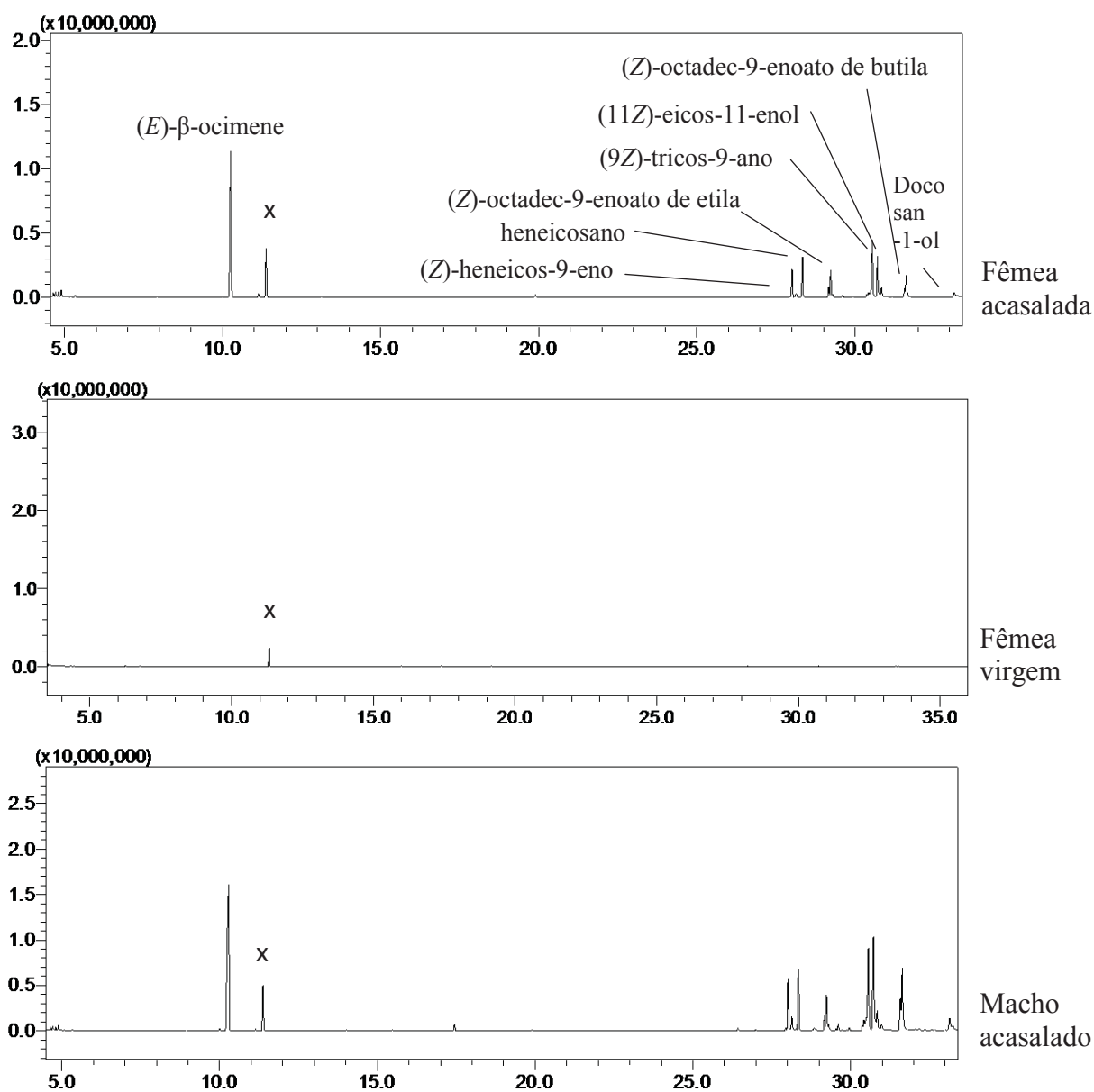
Em *H. erato phyllis* (FIGURA 51) e *H. ethilla narcaea* (FIGURA 52) a fêmea virgem não possui compostos na bolsa odorífera abdominal que após o acasalamento passam a possuir todos os compostos da glândula odorífera abdominal do macho.

FIGURA 51 - COMPARAÇÃO ENTRE CROMATOGRAMAS COM COMPOSTOS BIOATIVOS NOMEADOS DOS EXTRATOS DAS VALVAS DO MACHO ACASALADO, FÊMEA ACASALADA E FÊMEA VIRGEM DE *Heliconius erato phyllis*. (X), PADRÃO INTERNO (TETRADECANO, 100ppm A 5 $\mu$ L/EXTRATO)



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 52 - COMPARAÇÃO ENTRE CROMATOGRAMAS DOS EXTRATOS DAS VALVAS DO MACHO ACASALADO, FÊMEA ACASALADA E FÊMEA VIRGEM DE *Heliconius ethilla narcaea*



FONTE: O autor (2018).

### 3.2.4. Análise quantitativa dos compostos nas valvas dos machos não acasalados, machos acasalados e da bolsa odorífera abdominal da fêmea

As cisternas ou tanques dos lobos do saco odorífero abdominal da fêmea dos lepidópteros armazenam a secreção de feromônio, e devido ao seu tamanho e número irão determinar se a fêmea irá manter o bouquet antiafrodisíaco por mais tempo, aumentando as chances de defesa contra possíveis predados e diminuindo as chances de novos acasalamentos ou terá suas funções reduzidas por perda natural da secreção de feromônio.

O odor do saco odorífero abdominal de *Heliconius erato phyllis*, perceptível ao nariz humano, é bastante intenso em campo quando ocorre manipulação ou aproximação de fêmeas. Após o sacrifício e dissecação do saco odorífero abdominal o odor também se mantém fortemente, dependendo do modo de armazenamento das peças.

Assim, após a comparação entre a morfologia das cisternas dos lobos da bolsa odorífera abdominal da fêmea e as quantificações dos voláteis, em fêmeas dos lepidópteros, observou-se que as cisternas de *Heliconius erato phyllis* possuem menor tamanho e estão em maior quantidade, favorecendo o armazenamento da secreção. Assim em situações de defesa e recusa da corte estas fêmeas seriam mais bem-sucedidas, e verificou-se que o macho acasalado possui menor quantidade geral de compostos do que a fêmea após o acasalamento (FIGURA 53).

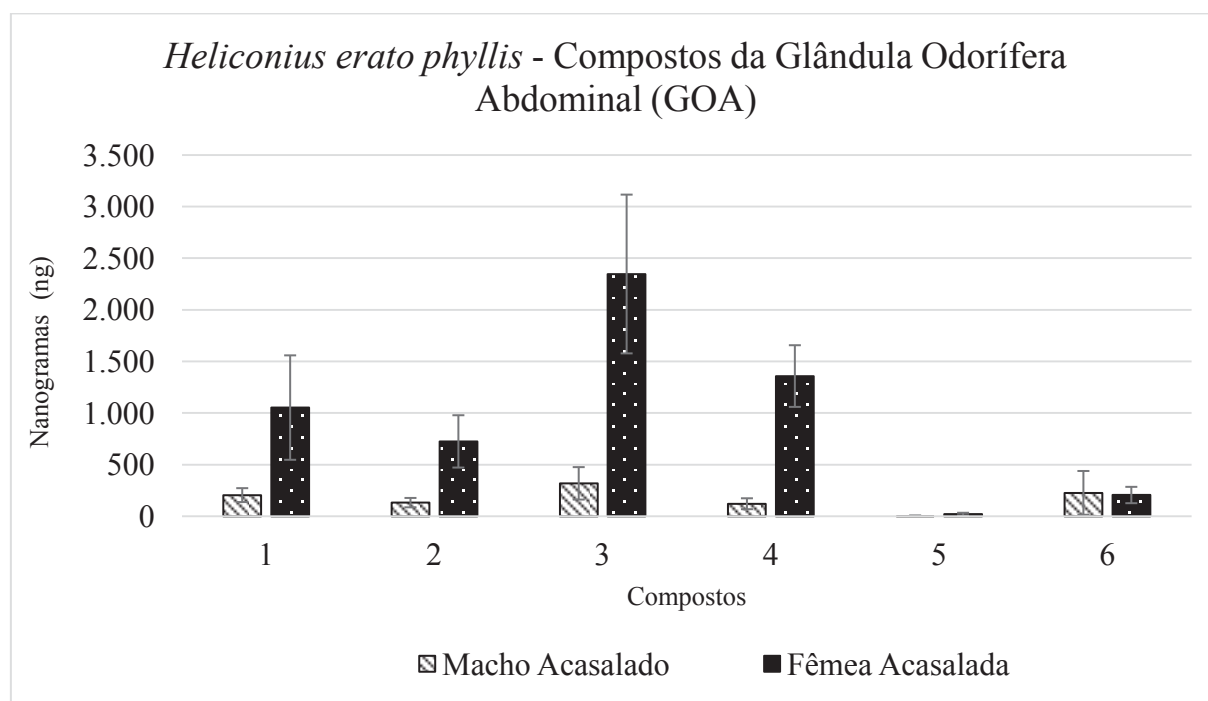
Já as cisternas da bolsa de *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei* possuem maior tamanho e estão em menor quantidade, não favorecendo o armazenamento da secreção, que seria mais facilmente perdida durante o próprio acasalamento e após este, nas situações de defesa e recusa de corte. Na quantificação dos compostos de fêmeas acasaladas de *Heliconius ethilla narcaea*, verificou-se que o macho acasalado possui maior quantidade geral de compostos do que a fêmea após o acasalamento (FIGURA 56). Em *Heliconius besckei* não foi possível a realização da quantificação dos compostos.

Em *H. erato phyllis*, para o macho não acasalado, comparando o valor observado das quantificações e o valor estimado (soma dos valores do macho acasalado com os valores da fêmea acasalada), notou-se que os compostos um (1), dois (2) e três (3) estavam abaixo do valor estimado, os compostos quatro (4) e cinco (5) estavam próximos do valor estimado e o composto seis (6) estava acima do valor

estimado (FIGURAS 54 E 55). Para os machos e fêmeas acasalados comparando os valores observados das quantificações observou-se que na fêmea acasalada todos os compostos bioativos estavam em média acima dos valores do macho. Confirmando dados de campo que apontam para a fêmea acasalada como tendo um cheiro muito forte quando comparado ao buquê de glândula abdominal do macho, dados da morfologia como a presença de maior número de pequenos tanques na superfície dos lobos da bolsa da fêmea.

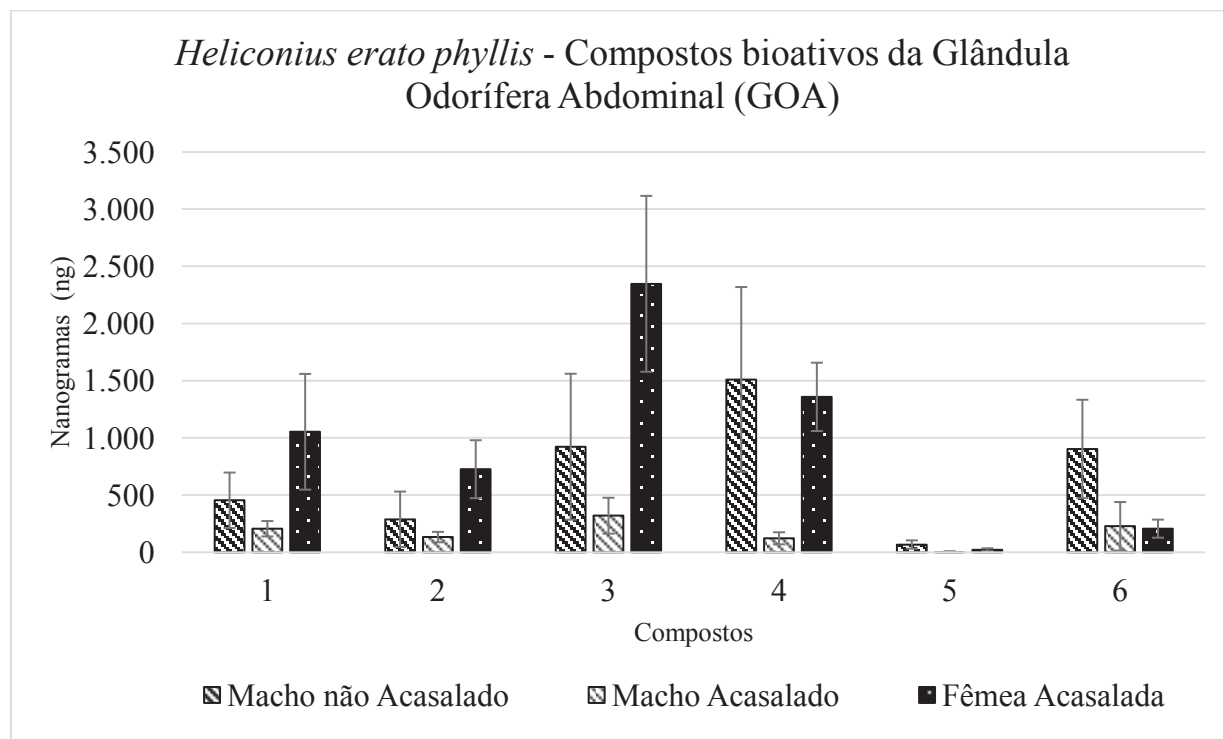
Em *H. ethilla narcaea*, para o macho não acasalado, comparando o valor observado das quantificações e o valor estimado (soma dos valores dos machos acasalados com os valores das fêmeas acasaladas), notou-se que todas as quantificações dos compostos estavam abaixo do valor estimado (FIGURAS 57 E 58). Para os machos e fêmeas acasalados comparando-se os valores observados das quantificações observou-se que na fêmea acasalada todos os compostos estavam em média abaixo dos valores do macho (FIGURA 56). Confirmando dados de campo que apontam para a fêmea acasalada como tendo um cheiro fraco quando comparado ao buquê de glândula abdominal do macho e à presença de maior número de grandes tanques na superfície dos lobos da bolsa da fêmea.

FIGURA 53 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL: DO MACHO ACASALADO E DA FÊMEA ACASALADA APÓS O ACASALAMENTO DE *Heliconius erato phyllis*



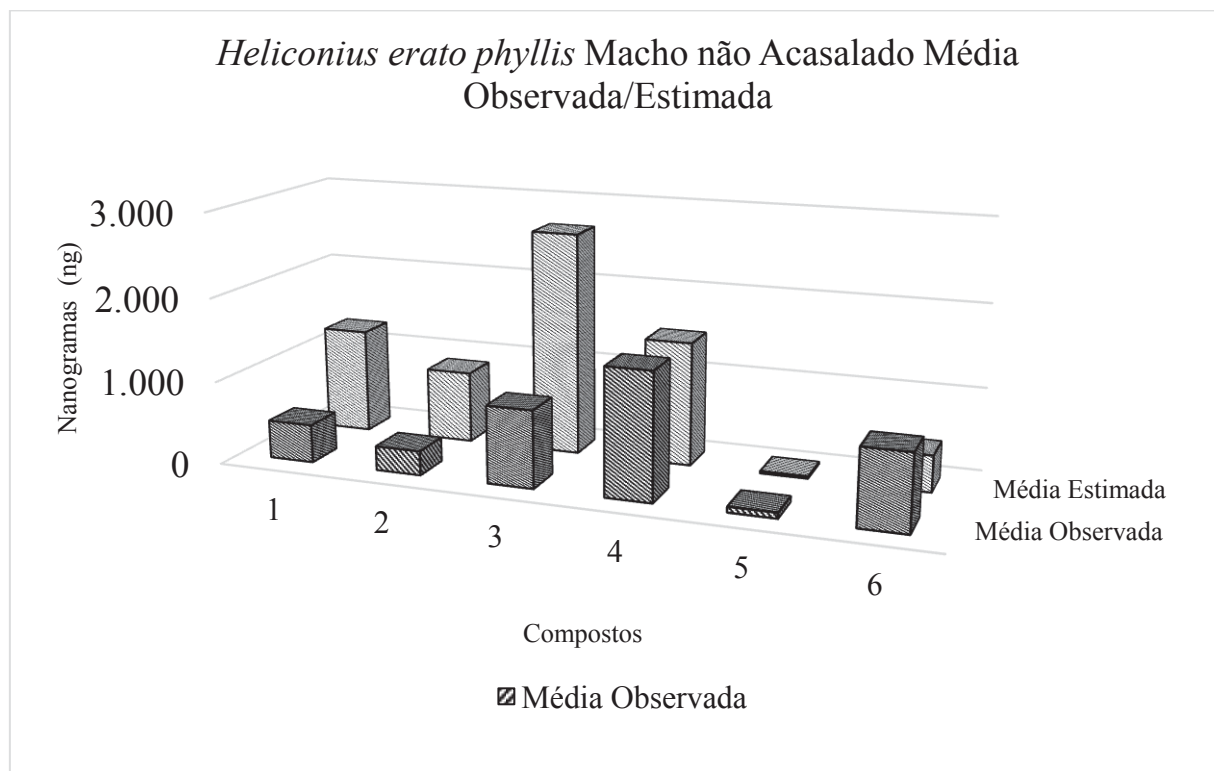
FONTE: O autor (2018).

FIGURA 54 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL: DO MACHO NÃO ACASALADO, E DO MACHO ACASALADO E DA FÊMEA ACASALADA APÓS O ACASALAMENTO DE *Heliconius erato phyllis*



FONTE: O autor (2018).

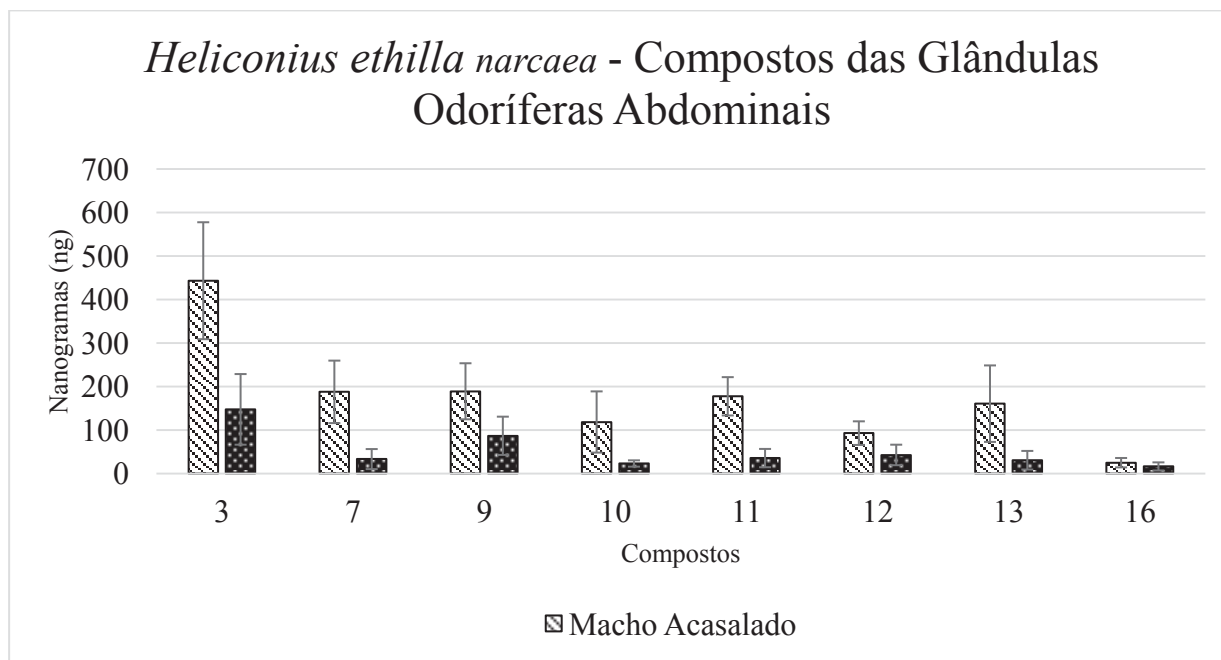
FIGURA 55 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL: DOS VALORES OBSERVADOS E ESTIMADOS PARA O MACHO NÃO ACASALADO (c) DE *Heliconius erato phyllis*



FONTE: O autor (2018).

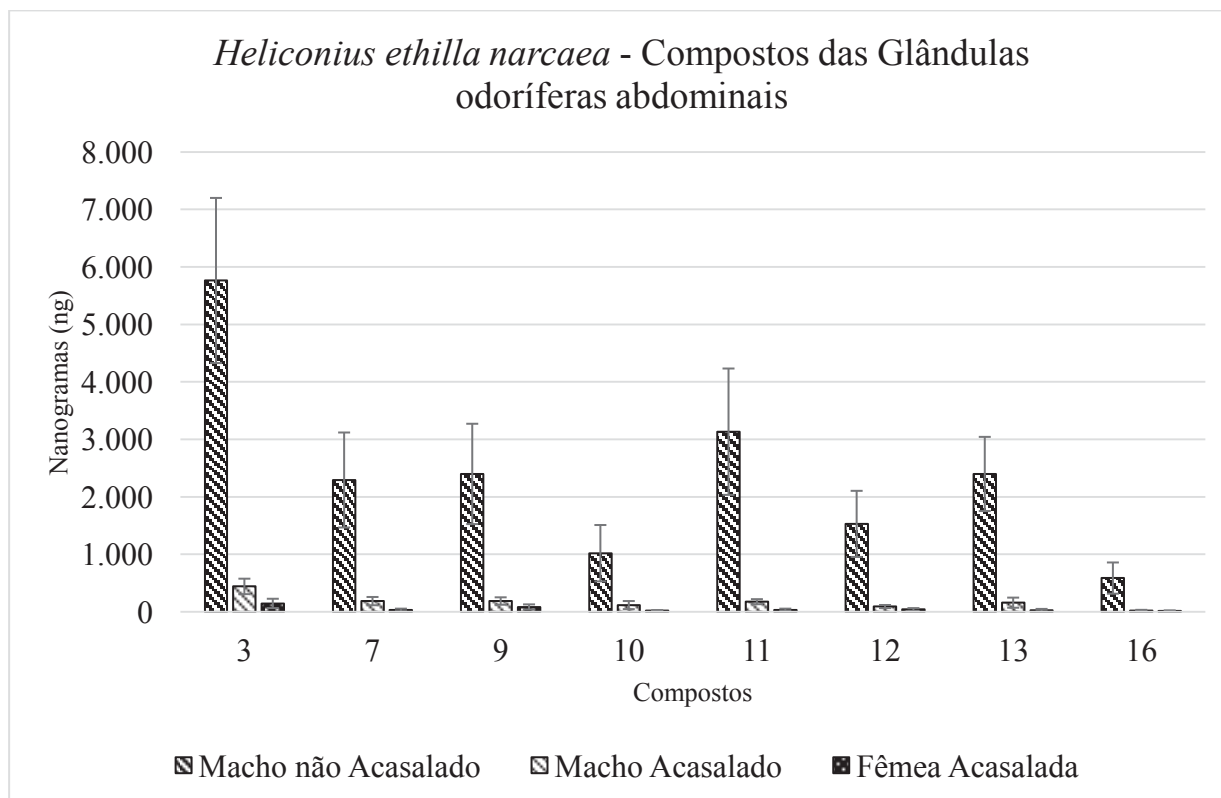


FIGURA 56 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL: DO MACHO ACASALADO E DA FÊMEA ACASALADA APÓS O ACASALAMENTO DE *Heliconius ethilla narcaea*



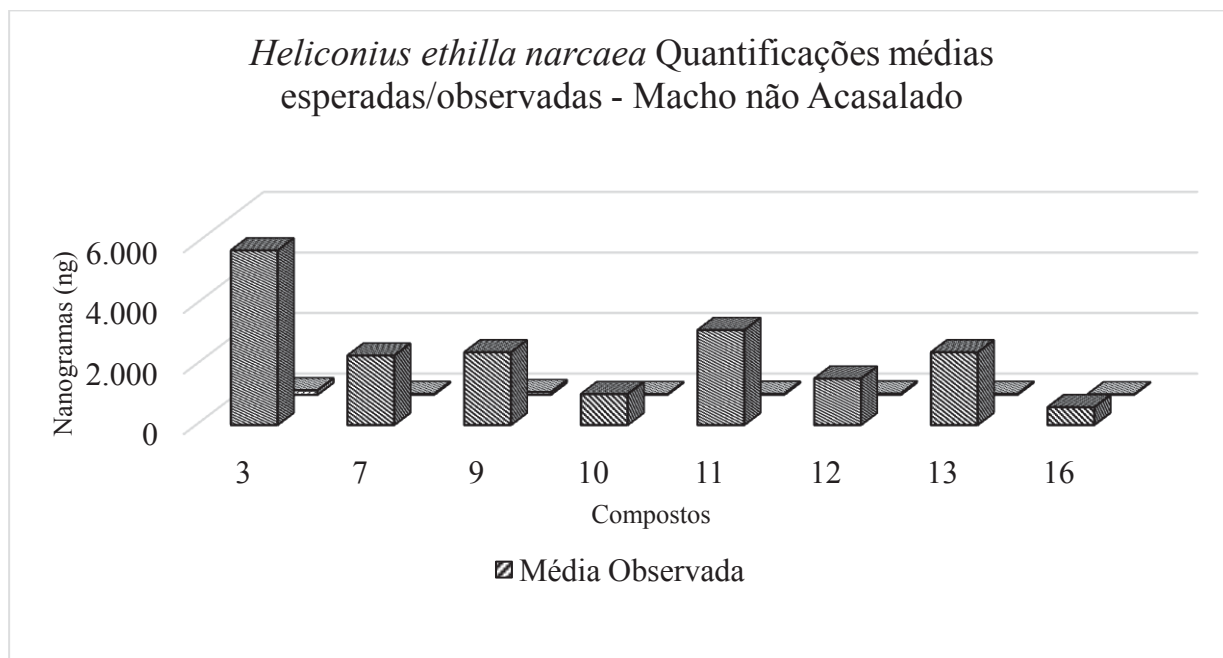
FONTE: O autor (2018).

FIGURA 57 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL: DO MACHO NÃO ACASALADO, E DO MACHO ACASALADO E DA FÊMEA ACASALADA APÓS O ACASALAMENTO DE *Heliconius ethilla narcaea*



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 58 - GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL: DOS VALORES OBSERVADOS E ESTIMADOS PARA O MACHO NÃO ACASALADO DE *Heliconius ethilla narcaea*

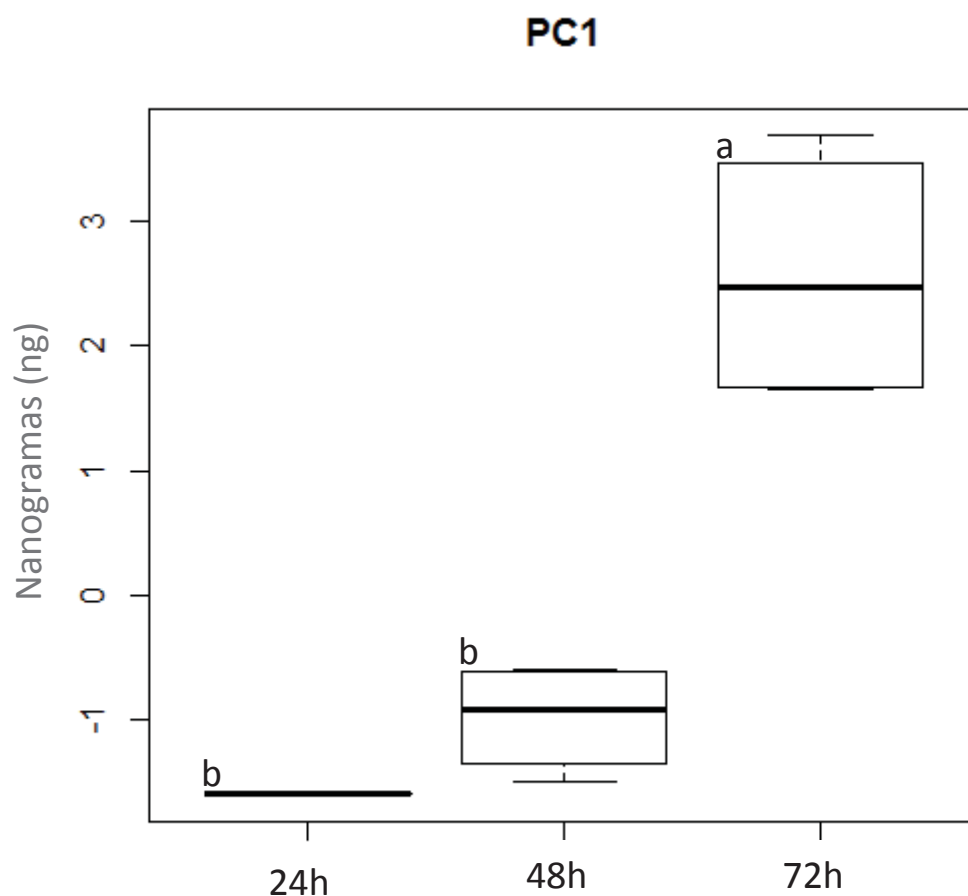


FONTE: O autor (2018).

### 3.2.5 Análises estatísticas

A maturação das glândulas odoríferas abdominais do macho de *Heliconius erato phyllis* ocorre três (3) dias após a emergência, ou seja, o macho exibe todos os compostos do bouquet odorífero do macho maduro (FIGURA 59).

FIGURA 59 - GRÁFICO DA ANÁLISE DE PCA,  $P = e-05$  \*\*\*, DAS QUANTIFICAÇÕES DOS COMPOSTOS DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL DO MACHO VIRGEM DE *Heliconius erato phyllis*, COM 24h, 48h e 72h APÓS A EMERGÊNCIA

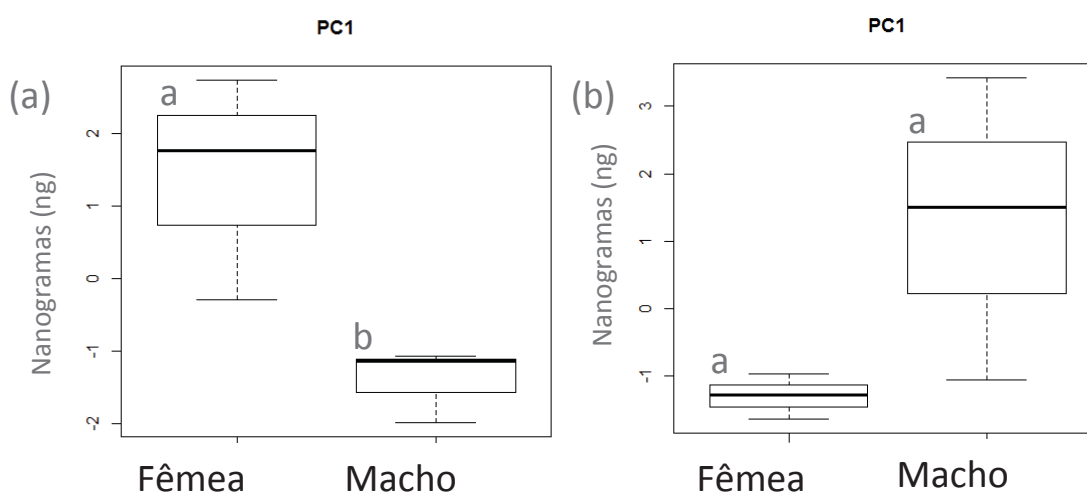


FONTE: O autor (2018).

Em *H. erato phyllis* as análises estatísticas entre macho acasalado e fêmea acasalada indicaram que a fêmea possui maior quantidade geral de compostos após o acasalamento (FIGURA 60a). Em *H. ethilla narcaea* as análises estatísticas entre

macho acasalado e fêmea acasalada indicaram que a fêmea possui menor quantidade geral de compostos após o acasalamento (FIGURA 60b).

FIGURA 60 - GRÁFICOS DAS ANÁLISES DE PCA DAS QUANTIFICAÇÕES DOS COMPOSTOS DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL DO MACHO ACASALADO E DA FÊMEA ACASALADA APÓS O ACASALAMENTO DE *Heliconius erato phyllis* (a),  $P= 0.04096^*$ , E *Heliconius ethilla narcaea* (b),  $P=0.1194$



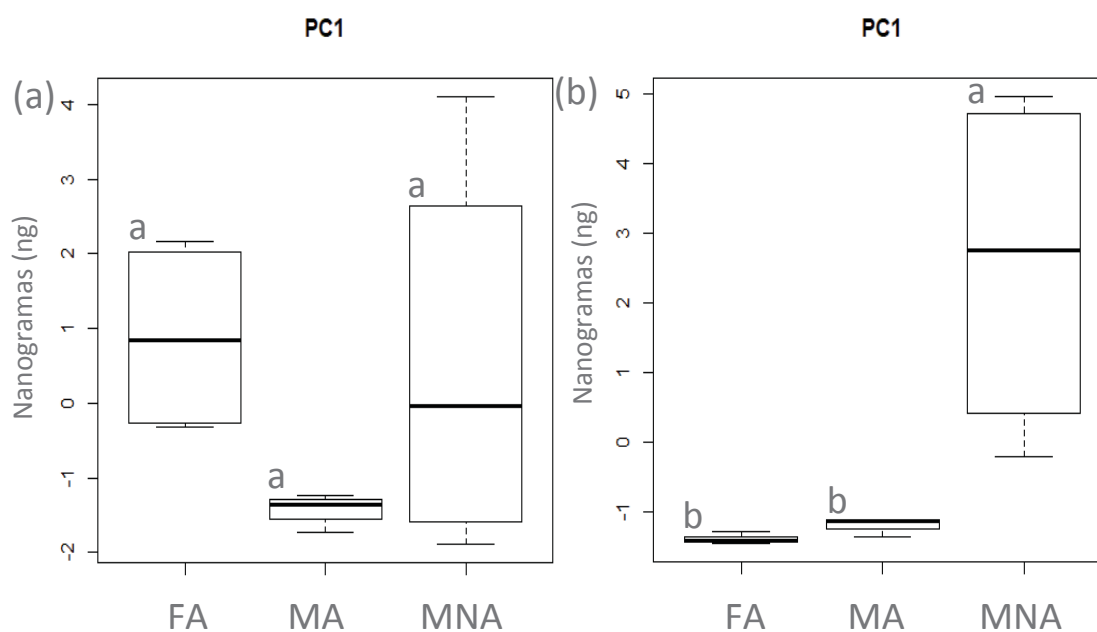
FONTE: O autor (2018).

Em *H. erato phyllis* as análises estatísticas entre macho não acasalado, macho acasalado e fêmea acasalada indicaram que o primeiro maior componente (PC1) da PCA (explicou 60,56% da variação) apresentou ANOVA não significativa (Traço Pillai = 0,034,  $F_4 = 3,296$ ,  $P = 0,19$ ). Os testes de Tukey não mostraram a distinção entre as três categorias: macho não acasalado (NMM), macho acasalado (MM) e fêmea acasalada (MF). Conclui-se que a quantidade de compostos bioativos não é significativamente diferente em cada uma das categorias analisadas (FIGURA 61a).

Em *H. ethilla narcaea* as análises estatísticas indicaram que o primeiro maior componente (PC1) da PCA (explicou 89,71% da variação) apresentou ANOVA significativa (Traço Pillai = 0,088,  $F_4 = 2,394$ ,  $P \leq 0,001^{**}$ ). Os testes de Tukey mostraram a distinção entre as categorias: macho não acasalado (NMM), e macho acasalado (MM) e fêmea acasalada (MF). Conclui-se que a quantidade de compostos

bioativos é significativamente diferente entre as categorias analisadas, macho não acasalado e macho e fêmea acasalados (FIGURA 61b).

FIGURA 61 - GRÁFICOS DAS ANÁLISES DE PCA DAS QUANTIFICAÇÕES DOS COMPOSTOS DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL DA FÊMEA ACASALADA (FA) E DO MACHO ACASALADO (MA) APÓS O ACASALAMENTO, E DO MACHO NÃO ACASALADO (MNA), E DE *Heliconius erato phyllis* (a) E *Heliconius ethilla narcaea* (b)

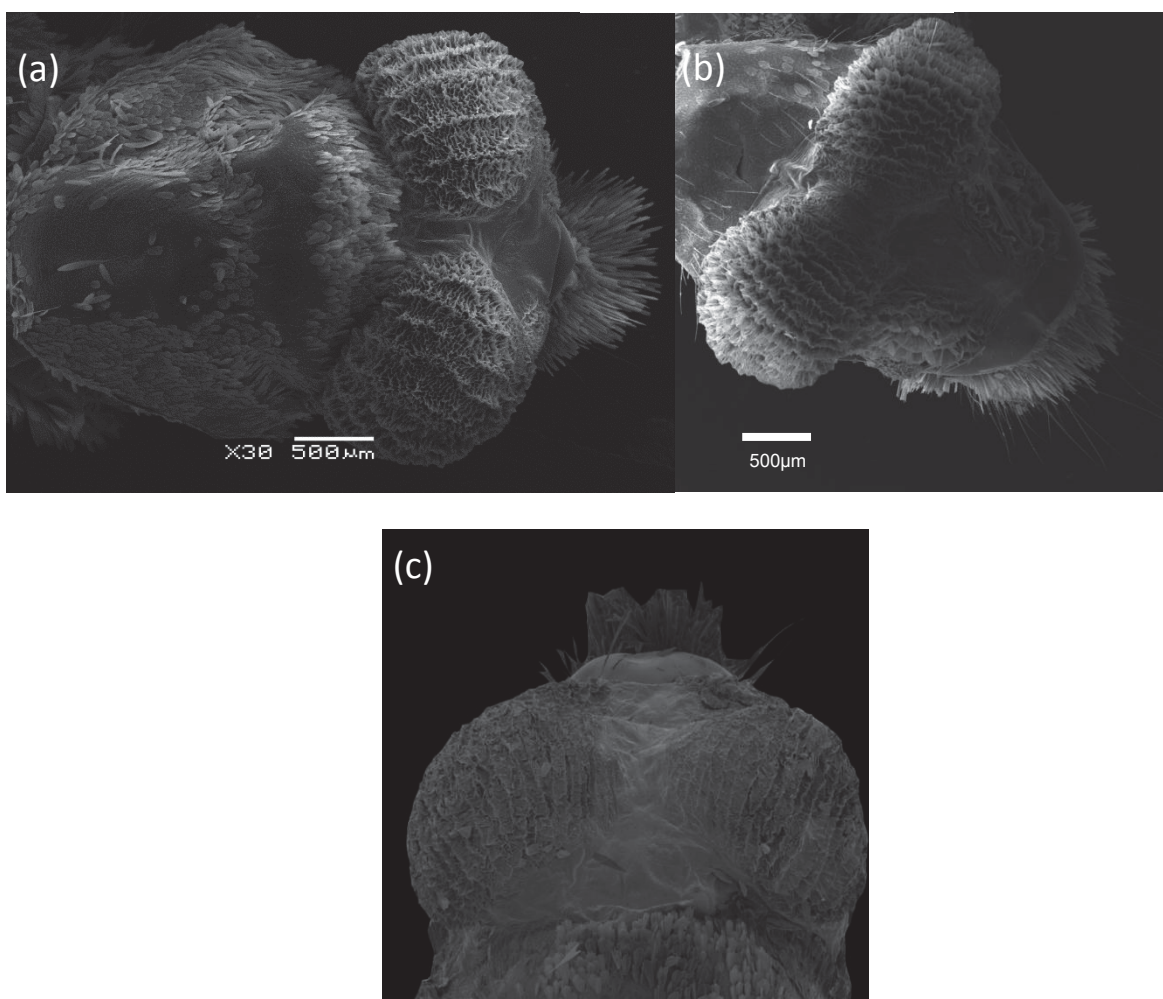


FONTE: O autor (2018).

### 3.2.6 Análise sobre a morfologia das glândulas odoríferas abdominais e o armazenamento de compostos

Como se podem observar nas imagens (FIGURA 62), as cisternas ou tanques dos lobos da bolsa odorífera abdominal de *Heliconius erato phyllis* apresenta uma estrutura semelhante a uma esponja, com inúmeros tanques pequenos na sua superfície. Em *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei* os tanques são maiores na sua maioria. Na imagem correspondente a *H. Besckei* observa-se os tanques cheios de secreção da fêmea acasalada.

FIGURA 62 - COMPARAÇÃO COM IMAGENS DE MEV, DO SACO ODORÍFERO ABDOMINAL DAS FÊMEAS VIRGENS DE *Heliconius erato phyllis* (a) e *Heliconius ethilla narcaea* (b). IMAGEM DO SACO ODORÍFERO ABDOMINAL DA FÊMEA ACASALADA DE *Heliconius besckei*, COM TANQUES CHEIOS DE SECREÇÃO (c)



FONTE: O autor (2017).

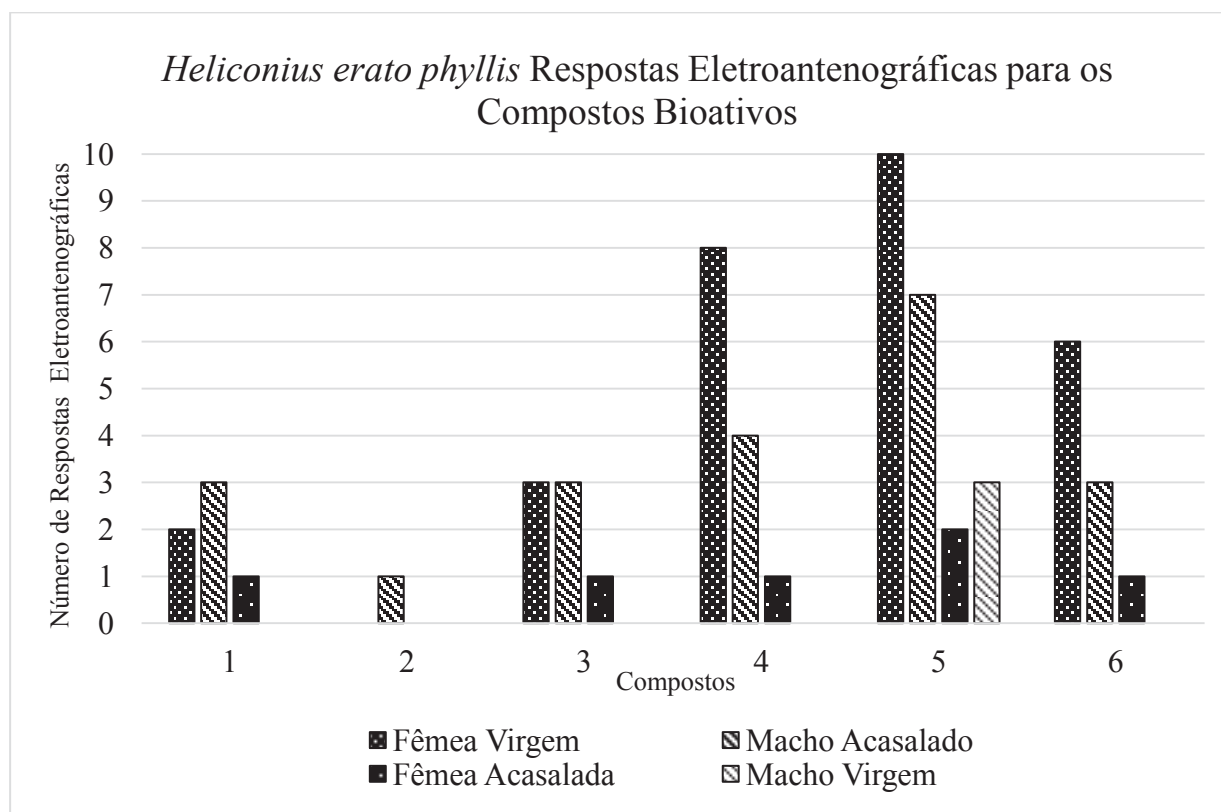
### 3.2.7 Análises eletroantenográficas

Os resultados eletroantenográficos mostram que seis compostos são bioativos no bouquet odorífero da glândula odorífera abdominal do macho de *H. erato phyllis*, para a antena da fêmea virgem (FIGURA 49).

As demais categorias também foram aferidas e os resultados totais de GC-EAD mostram que os compostos **(1)** 1-hexen-3-ona, **(2)** 1-octen-3-ona, **(3)** (*E*)- $\beta$ -ocimeno, **(4)** 3-undecanona, **(5)** 2,6,10-trimetiloxacicoundec-6-enona e **(6)** ácido (*E*)-2,3-dihidrofarnesóico são percebidos pelas antenas dos lepidópteros, com variação na magnitude da percepção dos compostos e no número de compostos percebidos por ambos os indivíduos virgens e acasalados de ambos os sexos. O composto cinco apresentou a maior intensidade de respostas eletroantenográficas em fêmeas virgens de *H. erato Phyllis* e machos maduros. O composto **1** mostra as seguintes percentagens de resposta eletroantenográfica para a fêmea virgem, macho maduro, fêmea acasalada e macho virgem: 20, 30, 50, 0, respectivamente. O composto **2** mostra as seguintes percentagens de resposta eletroantenográfica para fêmeas virgens, machos maduros, fêmeas acasaladas e machos virgens: 0, 10, 0, 0, respectivamente. O composto **3** mostra as seguintes percentagens de resposta eletroantenográfica para a fêmea virgem, macho maduro, fêmea acasalada e macho virgem: 30, 30, 50, 0, respectivamente. O composto **4** mostra as seguintes percentagens de resposta eletroantenográfica para fêmea virgem, macho maduro, fêmea feminina e macho virgem: 80, 40, 50, 0, respectivamente. O composto **5** mostra as seguintes percentagens de resposta eletroantenográfica para fêmeas virgens, machos maduros, fêmeas acasaladas e machos virgens: 100, 70, 50, 100, respectivamente. O composto **6** mostra as seguintes percentagens de resposta eletroantenográfica para fêmeas virgens, machos maduros, fêmeas acasaladas e machos virgens: 60, 30, 50, 0, respectivamente (FIGURA 63).



FIGURA 63 - GRÁFICO QUE MOSTRA O NÚMERO DE RESPOSTAS ELETOANTENOGRÁFICAS DA FÊMEA VIRGEM, MACHO ACASALADO, FÊMEA ACASALADA E MACHO VIRGEM PARA OS SEIS COMPOSTOS BIOATIVOS DO BOUQUET ODORÍFERO DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL DO MACHO DE *Heliconius erato phyllis*

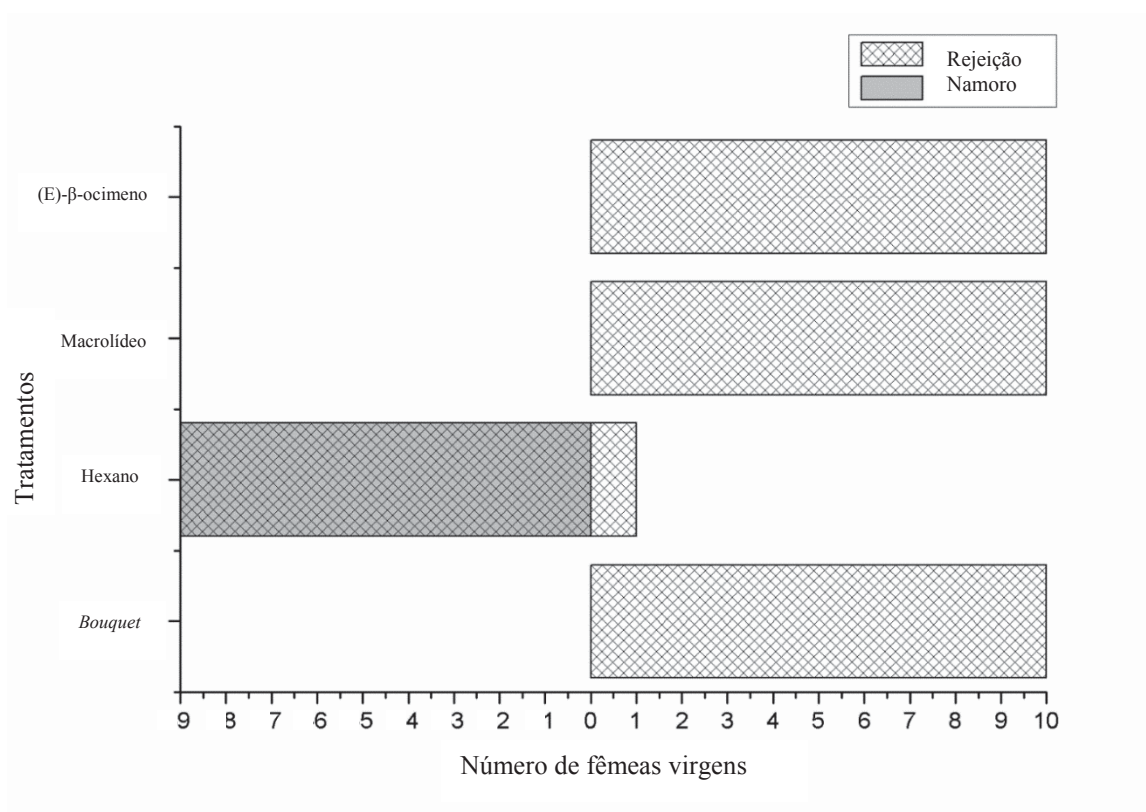


FONTE: O autor (2017).

### 3.2.8 Bioensaios – *Heliconius erato phyllis*

Em todos os resultados de dez bioensaios com o tratamento buquê odorífero, os machos rejeitaram a fêmea virgem tratada, com comportamento de partida e aproximação rápida. Em noventa por cento dos resultados de dez bioensaios com o tratamento hexano, os machos não rejeitaram a fêmea virgem tratada, com comportamentos de corte e acasalamento. Em todos os resultados de dez bioensaios com o tratamento 2,6,10-trimetiloxacicoundec-6-enona (composto com maior intensidade e quantidade de respostas eletroantenográficas), os machos rejeitaram a fêmea virgem tratada, com abordagem e comportamento de saída rápida. Em todos os resultados de dez bioensaios com o tratamento  $\beta$ -ocimeno (composto comum a outros Heliconiini), os machos rejeitaram a fêmea virgem tratada, com comportamento de aproximação e partida rápida. (FIGURA 64). (Nos quatro tratamentos, qui-quadrado:  $X^2 = 10$ ,  $P < 0,05$ ).

FIGURA 64 - COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NOS BIOENSAIOS QUE TESTARAM A REPULSÃO DE FÊMEAS DE *Heliconius erato phyllis* TRATADAS COM EXTRATO DO BOUQUET DA GLÂNDULA ODORÍFERA ABDOMINAL, (E)-3,7,11-trimetiloxacicoundec-7-en-2-ona (MACROLÍDEO COM MAIOR INTENSIDADE DE RESPOSTA DAS ANTENAS DE FÊMEAS VIRGENS E DE MACHOS ACASALADOS), OCIMENO (COMPOSTO COMUM AOS TRÊS LEPIDÓPTEROS ESTUDADOS) E A NÃO INTERFERÊNCIA DO HEXANO NOS BIOENSAIOS



FONTE: O autor (2018).

#### 4 DISCUSSÃO

As características morfológicas aqui discutidas, remetem a uma coevolução entre macho e fêmea nos lepidópteros estudados, com base nas hipóteses levantadas. Os tanques de armazenamento do antiafrodisíaco, com tamanhos variados, possivelmente tornam o armazenamento de *Heliconius erato phyllis* mais eficiente do que o de *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei*. Além disso, é provável que os dentículos na região apical da face interna da valva do macho segurem firmemente no saco odorífero da fêmea durante o acasalamento, assegurando que a secreção antiafrodisíaca passe para a bolsa da fêmea. Ockenfels *et al.* (1998) não encontraram evidências de que esta bolsa tenha uma função glandular em *Argynnis paphia* (Linnaeus, 1758) (Nymphalidae: Heliconiinae) sendo provavelmente uma condição existente em outras borboletas Heliconiinae.

O *bouquet* das glândulas odoríferas abdominais é facilmente dissipado através de uma breve exposição das glândulas, com a abertura do espaço entre as valvas pelo macho e com a protrusão do saco odorífero abdominal pelas fêmeas acasaladas. No insetário de reprodução seminatural, observou-se que durante a cópula, vários coespecíficos empoleiraram-se com asas fechadas próximas ao casal em cópula. Esse comportamento possivelmente está relacionado ao odor liberado pelas glândulas abdominais e pode contribuir para determinar a origem da formação de dormitórios comunitários.

A contribuição da morfologia das glândulas odoríferas abdominais para o sucesso adaptativo da espécie é sugerida além dos tanques de armazenamento do antiafrodisíacos, pelos dentículos que seguram a bolsa da fêmea. As cisternas ou tanques com a função de receber, armazenar e dissipar compostos antiafrodisíacos voláteis, e os dentículos, provavelmente, para garantir a transferência do antiafrodisíaco para a fêmea. O macho de *H. erato phyllis* seria mais eficiente em prender o saco odorífero abdominal da fêmea devido à presença de um número maior de dentículos proeminentes na extremidade cônica da superfície interna da valva do macho. Adicionando-se a este fato, a transferência do buquê específico do macho, com uma função sexual, que é armazenada por mais tempo devido à presença de minúsculos tanques nos lóbulos da bolsa abdominal da fêmea.

A variabilidade quantitativa em compostos de machos não acasalados, machos acasalados e fêmeas acasaladas podem ser resultado da variação genética do

espécime, da variação fisiológica causada pelo estresse biótico e abiótico, entre outros possíveis fatores. Acrescenta-se a estes o número de acasalamentos realizados, a duração da (as) cópula (as) e o tempo sem acasalamento desde a captura para machos não acasalados e machos acasalados, e a duração da (s) cópula (s) para fêmeas acasaladas. Apesar dos nossos esforços para manter a estabilidade ambiental e experimental, nossas tentativas de acasalamento entre fêmeas virgens e machos virgens não resultaram em cópula. Sabe-se que os machos virgens precisam aprender visualmente como proceder no namoro e na cópula. Um fato que requer condições ambientais ideais, não obtidas nas condições seminaturais do insetário utilizado. Machos virgens também se mostraram pouco sensíveis aos compostos bioativos do que as outras categorias, possivelmente devido às condições ambientais não ideais para percepção e aprendizado. Os resultados da análise química mostram que o macho transfere todo o seu buquê das glândulas odoríferas abdominais das valvas para a bolsa odorífera abdominal da fêmea, que apresenta o mesmo odor das glândulas presentes nas valvas dos machos, sendo pouco sensível aos mesmos. Portanto, possivelmente percebida como macho por coespecíficos.

As glândulas odoríferas abdominais das valvas dos machos de *Heliconius erato phyllis*, de acordo com o método de cromatografia em fase gasosa, têm uma composição química com algumas semelhanças com *H. melpomene* (SCHULZ *et al.*, 2008). Seis compostos que possuem atividade biológica intraespecífica e um com possível atividade interespecífica foram detectados. Com tempos de retenção mais baixos, dois compostos, 1-hexen-3-ona e 1-octen-3-ona são inicialmente observados, acredita-se que estejam provavelmente envolvidos na comunicação e na defesa intraespecífica.

O composto (*E*)- $\beta$ -ocimeno, antiafrodisíaco de *H. melpomene*, sugerimos ser um antiafrodisíaco interespecífico. O composto 3-undecanona provavelmente também envolve o alarme e a defesa. O composto 2,6,10-trimetiloxaciclundec-6-enona foi o composto com resposta eletroantegráfica significativa da fêmea virgem e macho acasalado para o extrato do macho maduro, corroborada pelos resultados obtidos nos bioensaios. Este composto está provavelmente relacionado ao reconhecimento específico do macho. Considerando que a evolução dos antiafrodisíacos em *Heliconiinae* é resultado da seleção intrassexual (ESTRADA *et al.*, 2011), a partir da competição entre machos, conclui-se que um composto específico do sexo masculino, presente no antiafrodisíaco, também evoluiu através desta seleção. A subespécie *H.*

*erato phyllis* é considerada monogâmica (KLEIN & ARAÚJO, 2010), e possivelmente o composto específico liberado pela bolsa da fêmea, é um dos elementos que contribuem para essa condição, possivelmente por ser percebida entre os receptores coespecíficos. *Heliconius erato*, assim como *H. erato phyllis*, formam dormitórios comunitários de modo circadiano e várias hipóteses evolutivas explicam a origem do fenômeno. Entre eles, o uso do mesmo como suporte de proteção contra predadores, como um centro de informações sobre fontes de alimentos etc. (ENDRINGER *et al.*, 2004). Inclui-se a possível existência de composto específico do macho em Heliconiinae, para a formação de dormitórios comunitários. A liberação do volátil (*E*)- $\beta$ -ocimeno pela planta hospedeira dos lepidópteros, *Passiflora edulis*, após a herbivoria, relatado no capítulo I deste trabalho, possivelmente provocaria a não ocorrência de acasalamento adulto ou pupal, nas proximidades da planta.

Nas observações de campo, papéis de filtro com extrato de glândulas odoríferas abdominais do macho foram pendurados por fio em árvores, e notou-se que este atraiu muitas espécies de borboletas. Este comportamento observado sugeriu a existência de compostos interespecíficos em extratos de glândulas abdominais de *H. erato phyllis*. A contribuição das glândulas odoríferas abdominais para o sucesso adaptativo da subespécie é sugerida pela transferência completa do *bouquet* odorífero do macho para a fêmea, somado a uma possível transferência de composto macho específico e à maior capacidade de armazenamento do *bouquet* pela fêmea; características estas que possivelmente promovem o reconhecimento intraespecífico e a monogamia da fêmea, permitindo à esta maior capacidade de sobrevivência e possivelmente a formação de dormitórios comunitários.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, J. Sexual conflict and anti-aphrodisiac tire in a polyandrous butterfly: male ejaculate tailoring and absence of female control. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 271, p. 1765–1770, 2004.
- ANDERSSON, J.; BORG-KARLSON, A. K.; WIKLUND, C. Anti-aphrodisiacs in pierid butterflies: a theme with variation. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, p. 1489–1499, 2003.
- ANDERSSON, J.; BORG-KARLSON, A. K.; WIKLUND, C. Sexual cooperation and conflict in butterflies: a male-transferred anti-aphrodisiac reduces harassment of recently mated females. **Proceedings of the Royal Society**, v. 267, p. 1271–1275, 2000.
- AYASSE, M.; PAXTON R. J.; TENGÖ, J. Mating behavior and chemical communication in the order Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 46, p. 31–78, 2001.
- BORGES, E. De O.; FACCIONE-HAUSER, M. C.; MOREIRA, G. P. R. Morphology of the prosternal glands of *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae), 2010. **Psyche**.
- BORGES, E. DE O.; MARTINS, C. B. C.; SILVA, R. R. DA; ZARBIN, P. H. G. Terpenoids dominate the bouquet of volatile organic compounds produced by *Passiflora edulis* in response to herbivory by *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Arthropod-Plant Interactions**, v. 12, p. 123, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11829-017-9560-2>
- DARRAG, K., VANJARI, S., MANN, F., GONZALEZ-ROJAS, M. F., MORRISON, C. R., SALAZAR, C., PARDO-DIAZ, C., MERRILL, R. M., MCMILLAN, W. O., SCHULZ, S. & JIGGINS, C. Male sex pheromone components in *Heliconius* butterflies released by the Androconia affect female choice. **PeerJ**, v. 5, p. e3953, 2017. <https://peerj.com/articles/3953/>
- EL-SAYED A. M. **The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals**. 2003-2018. Disponível em: <http://www.pherobase.com> Acesso em 2017.
- ELTRINGHAM, M. A. On the abdominal glands in *Colaenis*, *Dione* and *Eueides* (Lepidoptera). **Proceedings of the Royal Society London**, v. 74, p. 263–267, 1926.
- ELTRINGHAM, M. A. On the abdominal glands in *Heliconius* (Lepidoptera). **Transactions of the Royal Entomological Society of London, Parts I and II**, p. 269–275, 1925.
- ENDRINGER, F. B.; SILVA, P. R.; LUTZ, L. V. Hipóteses evolutivas sobre a origem e manutenção dos dormitórios comuns de *Heliconius erato* (Lepidoptera, Nymphalidae). **Natureza on line**, n. 2, v. 1, 1–9, 2004.
- ESTRADA, C. **Sexual behavior, intraspecific signaling and the evolution of mimicry among closely related species**. Ph.D. Thesis, University of Texas, Austin, 2009.
- ESTRADA, C.; SCHULZ, S.; YILDIZHAN, S.; GILBERT, L. E. Sexual selection drives the evolution of anti-aphrodisiac pheromones. **Evolution**, n. 65, v. 10, p. 2843–2854, 2011.
- ESTRADA, C.; YILDIZHAN, S.; SCHULZ, S.; GILBERT, L. E. Sex-specific chemical cues from immatures facilitate the evolution of mate guarding in *Heliconius* butterflies. **Proceedings of the Royal Society London**, v. 277, p. 407–413, 2009.



GILBERT, L. E. Postmating female odor in *Heliconius* butterflies: a male contributed anti-aphrodisiac? **Science**, v. 193, p. 419–420, 1976.

HAPP, G. Multiple sex pheromones of the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* L. **Nature**, v. 222, p. 180–181, 1969.

HUIGENS, M. E., WOELKE, J. B., PASHALIDOU, F. G., BUKOVINSZKY, T., SMID, H. M. & FATOUROSA, N. E. Chemical espionage on species-specific butterfly anti-aphrodisiacs by hitchhiking *Trichogramma* wasps. **Behavioral Ecology**, v. 21, p. 470–478, 2010.

KAMINSKI, L. A.; DELL'ERBA, R.; MOREIRA, G. R. P. Morfologia externa dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais: VI. *Dione moneta moneta* Hübner (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, p. 13–23, 2008.

KLEIN, A. L.; ARAUJO, A. M. Courtship behavior of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae) towards virgin and mated females: conflict between attraction and repulsion signals. **Journal of Ethology**, v. 28, p. 409–420, 2010.

KUKUK, P. Evidence for an anti-aphrodisiac in the sweat bee *Lasioglossum zephyrum* (Dialictus). **Science**, v. 227, p. 656–657, 1985.

KYRIACOU, C. P. Behavioural genetics: sex, flies and acetate. **Nature**, v. 446, p. 502–504. 2007.

LARSDOTTER-MELLSTROM, H.; ERIKSSON, K.; JANZ, N.; NYLIN, S.; CARLSSON, M. A. Male butterflies use an anti-aphrodisiac pheromone to tailor ejaculates. **Functional Ecology**, v. 30, p. 255–261, 2016.

LEITE, L. A. R.; CASAGRANDE, M. M.; MIELKE, O. H. H. External morphology of the adult of *Heraclides anchisiades capys* (Hübner, [1809]) (Lepidoptera – Papilionidae). I. Head, cephalic appendages and cervical region. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 1119–1126, 2010.

MIYAKADO, M.; MEINWALD, J.; GILBERT L. E. (R)-(Z, E)-9, 11-Octadecadien-13-olide: An intriguing lactone from *Heliconius pachinus* (Lepidoptera). **Experientia**, v. 45, p. 1006, 1989. <https://doi.org/10.1007/BF01953063>

MÜLLER, F. IX. The “Maracujá (or Passion-flowers) butterflies”, p. 651–667. In: Longmans, Green, and Co (Eds.). **Butterfly-hunting in many lands**. G. B. Longstaff, London, 729p, 1912.

OCKENFELS, P., BOPPRÉ, M., FISCHER, O. W. & SCHULTZ, S. **Chemical Communication in the Silver-Washed Fritillary, *Argynnis paphia* (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae)**. Poster from 15th Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology, 1998. <http://www.chemecol.org/meetings/98/posters.html>

R Development Core Team. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, 2011. URL <http://www.R-project.org/> .

ROSS, G. N., FALES, H. M., LLOYD, H. A., JONES, T., SOKOLOSKI, E. A., MARSHALL-BATTY, K. & BLUM, M. S. Novel chemistry of abdominal defensive glands of Nymphalid butterfly *Agraulis vanillae*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, p. 1219–1228, 2001.

ROSS, P.; CREWS, D. (1977) Influence of the seminal plug on mating behavior in the garter snake. **Nature**, v. 267, p. 344–345, 1977.

SCHULZ, S.; ESTRADA, C.; YILDIZHAN, S.; BOPPRÉ, M.; GILBERT, L. E. An anti-aphrodisiac in *Heliconius melpomene* butterflies. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 82–93, 2008.

SCHULZ, S.; YILDIZHAN, S.; STRITZKE, K.; ESTRADA, C.; GILBERT, L.E. Macrolides from the scent glands of the tropical butterflies *Heliconius cydno* and *Heliconius pachinus*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, n. 5, v. 21, p. 3434–3441, 2007.

SCOTT, D. Sexual mimicry regulates the attractiveness of mated *Drosophila melanogaster* females. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p. 8429–8433, 1986.

SEIDELMANN, K. The courtship-inhibiting pheromone is ignored by female-deprived gregarious desert locust males. **Biology Letters**, v. 2, p. 525–527, 2006.

ZHANG, Q. H.; ALDRICH, J. R. Male-produced anti-sex pheromone in a plant bug. **Naturwissenschaften**, v. 90, p. 505–508, 2003.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O composto ocimeno de *Passiflora edulis* provavelmente é transferido para o *bouquet* das Glândulas Odoríferas Abdominais (GOAs) dos lepidópteros através da alimentação das larvas, atuaria como um antiafrodisíaco interespecífico, evitando acasalamentos entre heteroespecíficos. Este composto evitaria acasalamentos nas proximidades da planta na qual exista atividade de herbivoria de larvas de *Heliconius erato phyllis*.

*Heliconius erato phyllis*, a subespécie mais abundante na Mata Atlântica possui *bouquets* para as GOAs e Androcônia Alar com maior quantidade e variedade de compostos, muito divergentes dos outros lepidópteros estudados. Assim, a GOA da fêmea de *H. erato phyllis* retém maior quantidade de secreção devido a morfologia da superfície externa da glândula. *Heliconius ethilla narcaea* e *Heliconius besckei* apresentam na Androcônia e GOA, menor variedade de compostos em comparação com *H. erato phyllis*, com maior quantidade de compostos semelhantes.

*Heliconius erato phyllis* possui vantagens adaptativas devido a sua diferenciação química, entre outras características, o que explicaria sua maior distribuição geográfica. A similaridade química entre *H. ethilla narcaea* e *H. besckei* evidenciaria espécie e subespécie com maior possibilidade de acasalamentos interespecíficos. Segundo relatos de alguns pesquisadores a espécie *Heliconius besckei* estaria entrando em extinção. Possivelmente as características aqui apuradas, como a semelhança existente entre compostos voláteis responsáveis por funções sexuais e reprodutivas com outra espécie, e a questão da morfologia interna da androcônia, que não favorece a liberação de feromônio seriam pontos chave para a sua extinção e modelo de intercorrência para outros lepidópteros.

## PROPOSTAS DE ESTUDO

No presente trabalho algumas análises não puderam ser feitas e seriam importantes para fornecer uma ideia mais ampla do efeito destes voláteis. Assim uma análise da atração de predadores e de fêmeas para oviposição, pelos voláteis de *P. edulis*, a atividade biológica dos voláteis de androcônia e das glândulas odoríferas abdominais dos lepidópteros e sua interespecificidade, iriam delinear com maior abrangência a ação destes voláteis. Bem como o estudo da influência da temperatura de desenvolvimentos dos ovos na determinação do sexo dos lepidópteros e os

fenômenos envolvidos no acasalamento pupal permitiriam melhor conhecer os lepidópteros e importância ecológica destes seres vivos tão especializados.

## REFERÊNCIAS

- ABE, F.; YAMAUCHI, T. Affinoside A and Companion Glycosides from the Stem and Bark of *Anodendron affine*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, n. 30, v. 4, p. 1183–1193, 1982.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.
- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira. Maracujá**. São Paulo: FNP, Consultoria e Agro informativos, p. 345, 2017.
- AGUIAR-MENEZES, E. L.; MENEZES, E. B.; CASSINO, P. C. R.; SOARES, M. A. Passion fruit. In: PEÑA, J. L.; Sharp, J. L.; Wysoki, M. (Ed.). **Tropical fruit pests and pollinators: economic importance, natural enemies and control**. Nova York: CAB International, p. 361–390, 2002.
- AMENT, K.; KANT, M. R.; SABELIS, M. W.; HARING, M. A.; SCHUURINK, R. C. Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. **Plant Physiology**, n. 135, v. 4, p. 2025–2037, 2004.
- ANDERSON, A. R.; WANNER, K. W.; TROWELL, S. C.; WARR, C. G.; JAQUIN-JOLY, E.; ZAGATTI, P.; ROBERTSON, H.; NEWCOMB, R. D. Functional analysis of female-biased odorant receptors from the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 189–197, 2009.
- ANDERSSON, J. Sexual conflict and anti-aphrodisiac tire in a polyandrous butterfly: male ejaculate tailoring and absence of female control. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 271, p. 1765–1770, 2004.
- ANDERSSON, J., BORG-KARLSON A., VONGVANICH N. & WIKLUND C. Male sex pheromone release and female mate choice in a butterfly. **Journal of Experimental Biology**, 210, 964–970, 2007.
- ANDERSSON, J.; BORG-KARLSON, A. K.; WIKLUND, C. Antiaphrodisiacs in pierid butterflies: a theme with variation! **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, p. 1489–1499, 2003.
- ANDERSSON, J.; BORG-KARLSON, A. K.; WIKLUND, C. Sexual cooperation and conflict in butterflies: a male-transferred anti-aphrodisiac reduces harassment of recently mated females. **Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences**, v. 267, p. 1271–1275, 2000.
- ANDERSSON, M. **Sexual Selection**. Princeton, NJ: Princeton University Press, p. 599, 1994.
- ARIMURA, G. I.; MATSUI, K.; TAKABAYASHI, J. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. **Plant and Cell Physiology**, n. 50, p. 911–923, 2009. <http://doi:10.1093/pcp/pcp030>
- ARIMURA, G.; KÖPKE, S.; KUNERT, M.; VOLPE, V.; DAVID, A.; BRAND, P. *et al.* Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves: IV. Diurnal and nocturnal damage differentially initiate plant volatile emission. **Plant Physiology**, n. 146, p. 965–973, 2008. <http://doi:10.1104/pp.107.111088>
- AUSSEM, B. Eine neue satyride der gattung *Pseudochazara* de Lesse, 1951 aus Afghanistan (Satyridae). **Nota Lepidopterologica**, v. 3, p. 5–15, 1980.

AYASSE, M.; PAXTON R. J.; TENGÖ, J. Mating behavior and chemical communication in the order Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 46, p. 31–78, 2001.

AYMONE, A. C. B., VALENTE, V. L. S. & ARAÚJO, A. M. Ultrastructure and morphogenesis of the wing scales in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae): What silvery/brownish surfaces can tell us about the development of color patterning? **Arthropod Structure & Development**, v. 42, p. 349–359, 2013.

BAKER, T. C.; CARDÉ, R. T. Courtship behavior of the oriental fruit moth (*Grapholita molesta*): experimental analysis and consideration of the role of sexual selection in the evolution of courtship pheromones in the Lepidoptera. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 72, n. 1, p. 73–88, 1979.

BALDWIN, I. T.; HALITSCHKE, R.; PASCHOLD, A.; VON DAHL, C. C.; PRESTON, C. A. Volatile signaling in plant-plant interactions: “Talking Trees” in the genomics era. **Science**, v. 311, p. 812–815, 2006.

BALUSAMY, S. R. D.; RAHIMI, S.; SUKWEENADHI, J.; KIM, Y.-J.; YANG, D.-C. Exogenous methyl jasmonate prevents necrosis caused by mechanical wounding and increases terpenoid biosynthesis in *Panax ginseng*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, p. 341–348, 2015. <http://doi:10.1007/s11240-015-0838-8>

BARROZO, R. B.; KAISLING, K. E. Repetitive stimulation of olfactory receptor cells in female silkmoths *Bombyx mori* L. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, p. 825–834, 2002.

BARTH, R. Maennliche Duf torgane Brasilianischer lepidopteren. 22. Mitteilung: *Hammaptera frondosata* Guer. (Geometridae, Lareintiinae). **Instituto Oswaldo Cruz**, n. 31, v. 4, p. 567–576, 1959.

BARTH, R. O órgão odorífero abdominal do macho de *Caligo arisbe* Hbn. (Lepidoptera, Brassolidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 51, p. 203–219, 1953.

BARTH, R. Os órgãos odoríferos masculinos de alguns Heliconiinae do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 50, p. 335–385, 1952.

BEALE, M. H.; BIRKETT, M. A.; BRUCE, T. J. A.; CHAMBERLAIN, K.; FIELD, L. M.; HUTTLY, A. K.; MARTIN, J. L.; PARKER, R.; PHILLIPS, A. L.; PICKETT, J. A.; PROSSER, I. M.; SHEWRY, P. R.; SMART, L. E.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M.; ZHANG, Y. Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphids and parasitoid behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 27, v. 103, p.10509–10513, 2006.

BEEBE, W.; CRANE, J.; FLEMING, H. A comparison of eggs, larvae and pupae fourteen species of Heliconiinae butterflies from Trinidad, W. I. **Zoologica**, v. 45, p. 111–153, 1960.

BENSON, W. W.; BROWN, K. S. J.; GILBERT, L. E. Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. **Evolution**, n. 29, p. 659–680, 1976.

BERGSTRÖM, G.; LUNDGREN, G. Androconial secretion of three species of butterflies of the genus *Pieris* (Lep., Pieridae). **Zoon Supplement**, v. 1, p. 67–75, 1973.

BERRY, P. E. **Passifloraceae plant family**. British Encyclopedia, 2018. Disponível em <https://www.britannica.com/plant/Passifloraceae>. Acesso em 17/09/2018.

BIANCHI, V.; MOREIRA, G. R. P. Preferência alimentar, efeito da planta hospedeira e da densidade larval na sobrevivência e desenvolvimento de *Dione juno juno* (Cramer),

(Lepidoptera, Nymphalidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, n. 22, v. 1, p. 43–50, 2005.

BIRCH, M. C., POPPY, G. M., BAKER, T. C. Scents and reversible structures of male moths. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 25–58, 1990.

BOPPRÉ, M. & VANE-WRIGHT, R. I. Androconial systems in Danainae (Lepidoptera): functional morphology of *Amauris*, *Danaus*, *Tirumala* and *Euploea*. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 97, p. 101–133, 1989.

BOPPRÉ, M. Chemically mediated interactions between butterflies. In: Vane-Wright RI, Ackery PR (eds) **The Biology of Butterflies**, v. 11, Academic Press, London, p. 259–275, 1984.

BOPPRÉ, M. Insects pharmacophagously utilizing defensive plant chemicals (pyrrolizidine alkaloids). **Naturwissenschaften**, v. 73, p. 17–26, 1986.

BOPPRÉ, M. Lepidoptera and pyrrolizidine alkaloids, exemplification of complexity in chemical ecology. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, p. 165–185, 1990.

BORGES, E. DE O.; FACCIONE-HAUSER, M. C.; MOREIRA, G. P. R. Morphology of the prosternal glands of *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae), 2010. **Psyche**.

BORGES, E. DE O.; MARTINS, C. B. C.; SILVA, R. R. DA; ZARBIN, P. H. G. Terpenoids dominate the bouquet of volatile organic compounds produced by *Passiflora edulis* in response to herbivory by *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Arthropod-Plant Interactions**, v. 12, p. 123, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11829-017-9560-2>

BOTELHO-JÚNIOR, S.; SIQUEIRA-JR, C. L.; JARDIM, B. C.; MACHADO, O. L.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; PERALES, J.; JACINTO, T. Trypsin inhibitors in passion fruit (*Passiflora f. edulis flavicarpa*) leaves: accumulation in response to methyl jasmonate, mechanical wounding, and herbivory. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 9404–9409, 2008.

BRAGA, G. C.; PRADO, A.; DA PINTO, J. S.; DE ALENCAR, S. M. Volatile profile of yellow passion fruit juice by static headspace and solid phase micro extraction techniques. **Ciência Rural**, n. 2, v. 45, p. 356–363, 2015.

BROWER, L. P., BROWER, J. V. Z.; CRANSTON, F. P. Courtship behaviour of the queen butterfly, *Danaus gilippus berenice* (Cramer). **Zoologica**, v. 50, p. 1-39, 1965.

BROWN, J. A review of the genus *Pseudochazara* de Lesse, 1951 (Lep., Satyridae) in Greece. **Entomologist's Gazette**, v. 27, p. 85–90, 1976.

BROWN, K. S. Chemical ecology of dehydropyrrolizidine alkaloids in adult Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 44, p. 435–460, 1984.

BROWN, K. S. JR.; MIELKE, O. H. H. The Heliconians of Brazil (Lepidoptera: Nymphalidae). Part II. Introduction and General Comments, with a supplementary Revision of the Tribe. **Zoologica (NY)**, v. 57, p. 1–40, 1972.

BRUCE, T. J. A.; PICKETT, J. A. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects – Finding the right mix. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1605-1611, 2011.

BRUCE, T. J.; MATTHES, M.; CHAMBERLAIN, K.; WOODCOCK, C. M.; MOHIB, A.; WEBSTER, B.; SMART, L. E.; BIRKETT, M. A.; PICKETT, J. A.; NAPIER, J. A. Cis-Jasmone induces *Arabidopsis* genes that affect the chemical ecology of multitrophic interactions with aphids and their parasitoids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 12, v. 105, p. 4553–4558, 2008.

BUTENANDT, A.; BECKMANN, R.; STAMM, D.; HECKER, E. Über den sexuallockstoff des seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und Konstitution. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 14b, p. 283–284, 1959.

BUTENANDT, A.; HECKER, E. Synthese des bombykols, des sexual-lockstoffes des seidenspinners, und seiner geometrischen Isomeren. **Angewandte Chemie**, v. 73, p. 349–353, 1961.

CARDOSO, M. Z. New for *Heliconius besckei* Ménétriés and *Heliconius sara* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae) in Bahia, Brazil. **Neotropical Entomology** n. 34, v. 6, p. 1007–1008, 2005.

CHEN, F.; THOLL, D.; BOHLMANN, J.; PICHERSKY, E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. **Plant Journal**, n. 66, v. 1, p. 212–229, 2011.

CLUTTON-BROCK, T. H.; PARKER, G. A. Sexual coercion in animal societies. **Animal Behaviour**, v. 49, p. 1345–1365, 1995. <https://doi.org/10.1006/anbe.1995.0166>

CONDAMIN, M. **Monographie du genre *Bicyclus* (Lepidoptera: Satyridae)**. Dakar: IFAN, 1973.

CORREIA, M. E. F.; OLIVEIRA, L. C. M. **Fauna de Solo: Aspectos Gerais e Metodológicos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p. 46, 2000.

COSTANZO, K.; MONTEIRO, A. The use of chemical and visual cues in female choice in the butterfly *Bicyclus anynana*. **Proceedings of the Royal Society**, v. 274, p. 845–851, 2007.

CROCK, J.; WILDUN, G. M.; CROTEAU, R. Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha x piperita*, L) that produces the aphid alarm pheromone (*E*)- $\beta$ -farnesene. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 94, p. 12833–12838, 1997.

CRUZ, D.; EIZAGUIRRE, M. Response to conspecific and heterospecific semiochemicals by *Sesamia nonagrioides* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae) gravid females. **Bulletin of Entomological Research**, p. 1–8, 2015.

DARRAG, K., VANJARI, S., MANN, F., GONZALEZ-ROJAS, M. F., MORRISON, C. R., SALAZAR, C., PARDO-DIAZ, C., MERRILL, R. M., MCMILLAN, W. O., SCHULZ, S. & JIGGINS, C. Male sex pheromone components in *Heliconius* butterflies released by the androconia affect female choice. **PeerJ**, v. 5, p. e3953, 2017. <https://peerj.com/articles/3953/>

DE BRITO SANCHEZ, M. G.; KAISLING, K. E. Inhibitory and excitatory effects of iodoben-zene on the antennal benzoic acid receptor cell of the female silk moth *Bombyx mori* L. **Chemical Senses**, v. 30, p. 435–442, 2005.

DE MORAES, C. M.; LEWIS, W. J.; PARE, P. W. Herbivore infested plants selectively attract parasitoids. **Nature**, v. 393, p. 570–573, 1998.

DE MORAES, C. M.; MESCHER, M. C.; TUMLINSON, J. H. Caterpillar induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. **Nature**, v. 410, p. 577–580, 2001.

DEGENHARDT, J.; HILTPOLD, I.; KÖLLNER, T. G.; FREY, M.; GIERL, A.; GERSHENZON, J.; HIBBARD, B. E.; ELLERSIECK, M. R.; TURLINGS, T. C. J. Restoring a maize root signal that attracts insect-killing nematodes to control a major pest. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, n. 106, v. 32, p. 13213–13218, 2009.



- DEINERT, E. I., LONGINO, J. T., GILBERT, L. E. Mate competition in butterflies. **Nature**, v. 370, p. 23–24, 1994. <https://doi.org/10.1038/370023a0>
- DELPHIA, C. M.; ROHR, J. R.; STEPHENSON, A. G.; DE MORAES, C. M., MESCHER, M. C. Effects of genetic variation and inbreeding on volatile production in a field population of horsenettle. **International Journal of Plant Sciences**, n. 170, v. 1, p. 12–20, 2009.
- DICKE, M.; BALDWIN, I. T. The evolutionary context for herbivore induced plant volatiles: beyond the ‘cry for help’. **Trends in Plant Sciences**, n. 15, v. 3, p. 167–175, 2010.
- DICKE, M.; LORETO F. Induced plant volatiles: from genes to climate change. **Trends in Plant Science**, v.15, n.3, p. 115-117, 2010.
- DOWNEY, J. C. & ALLYN, A. C. Wing-scale Morphology and Nomenclature. **Bulletin of the Allyn Museum**, v. 31, p. 1–32, 1975.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. **Plant Physiology**, v. 122, p. 627–633, 2000.
- DUSSORD, D. E., HARVIS, C. A., MEINWALD, J. & EISNER, T. Pheromonal advertisement of a nuptial gift by a male moth (*Utetheisa ornatrix*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 9224–9227, 1991. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.20.9224>
- EDGAR, J. A.; CULVENOR, C. C. J.; PLISKE, T. E. Isolation of a lactone, structurally related to the esterifying acids of pyrrolizidine alkaloids, from the coastal fringes of male Ithomiinae. **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, p. 263–270, 1976.
- EDWARDS, W. H. On certain habits of *Heliconia charitonia* Linn., a species of butterfly found in Florida. **Papilio**, v. 1, p. 209–215, 1881.
- EHRlich, P. R.; RAVEN, P. H. Butterflies and Plants: a study in coevolution. **Evolution**, n. 4, v. 18, p. 586–608, 1964.
- EL-SAYED, A. M. **The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals**, 2003-2018. Disponível em <http://www.pherobase.com> Acessos em 12/09/2017.
- ELTRINGHAM, M. A. On the abdominal glands in *Colaenis*, *Dione* and *Eueides* (Lepidoptera). **Proceedings of the Royal Society London**, v. 74, p. 263–267, 1926.
- ELTRINGHAM, M. A. On the abdominal glands in *Heliconius* (Lepidoptera). **Transactions of the Royal Entomological Society of London, Parts I and II**, p. 269–275, 1925.
- ENDRINGER, F. B.; SILVA, P. R.; LUTZ, L. V. Hipóteses evolutivas sobre a origem e manutenção dos dormitórios comuns de *Heliconius erato* (Lepidoptera, Nymphalidae). **Natureza on line**, n. 2, v. 1, 1–9, 2004.
- ESTRADA, C. **Sexual behavior, intraspecific signaling and the evolution of mimicry among closely related species**. Ph.D. Thesis, University of Texas, Austin, 2009.
- ESTRADA, C., GILBERT, L. E. Host plants and immatures as mate-searching cues in *Heliconius* butterflies. **Animal Behaviour**, v. 80, p. 231–239, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.04.023>

ESTRADA, C.; SCHULZ, S.; YILDIZHAN, S.; GILBERT, L. E. Sexual selection drives the evolution of anti-aphrodisiac pheromones. **Evolution**, n. 65, v. 10, p. 2843–2854, 2011.

ESTRADA, C.; YILDIZHAN, S.; SCHULZ, S.; GILBERT, L. E. Sex-specific chemical cues from immatures facilitate the evolution of mate guarding in *Heliconius* butterflies. **Proceedings of the Royal Society London**, v. 277, p. 407–413, 2009.

FADINI, M. A. M.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C. Manejo integrado de pragas do maracujazeiro. **Informe Agropecuário**, n. 21, v. 206, p. 29–33, 2000.

FANCELLI, M.; DE ALMEIDA A. Insetos-praga e seu controle. In: LIMA, A. de A. (Ed.). **Maracujá - Produção: aspectos técnicos**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, c. 10, p. 57–66, 2002.

FATOUROS, N. E.; LUCAS-BARBOSA, D.; WELDEGERGIS, B. T.; PASHALIDOU, F. G.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M.; HARVEY, J. A.; GOLS, R.; HUIGENS, M. E. Plant volatiles induced by herbivore egg deposition affect insects of different trophic levels. **Public Library of Science one**, n. 7, v. 8, p. e43607, 2012.

FERREIRA, J. T. B.; ZARBIN, P. H. G. Amor ao primeiro odor: A comunicação química entre os insetos. **Química Nova na Escola**, n. 2, v. 7, p. 3–6, 1998.

FORSBERG, J.; WIKLUND, C. Mating in the afternoon: time-saving in courtship and remating by females of a polyandrous butterfly *Pieris napi*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 25, p. 349–356, 1989.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica, no período de 2016 a 2017**. Relatório técnico, 2018. Disponível em [http://mapas.sosma.org.br/site\\_media/download/Atlas\\_Mata\\_Atlantica\\_2016-2017\\_relatorio\\_tecnico\\_2018\\_final.pdf](http://mapas.sosma.org.br/site_media/download/Atlas_Mata_Atlantica_2016-2017_relatorio_tecnico_2018_final.pdf). Acesso em 20/10/2018.

GHIRADELLA, H. Hairs, Bristles, and Scales. In: **Microscopic anatomy of invertebrates**. Wiley-Liss. Inc. Vol 11A, Insecta, p 257–287, 1998.

GHIRADELLA, H. Insect Cuticular Surface Modifications: Scales and Other Structural Formations. In **Advances in insect physiology**, Vol. 38, Elsevier Ltd., 2010. ISBN 978-0-12-381389-3 [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(10\)38006-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(10)38006-4)

GILBERT, L. E. Biodiversity of a Central American *Heliconius* community: pattern, process and problems. In: Price PW, Fernandes GW, Benson WW (eds) **Plant-animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions**. Wiley, New York, p. 403–427, 1991.

GILBERT, L. E. Butterfly-plant evolution: has *Passiflora adenopoda* won the selectional race with heliconiine butterflies? **Science**, n. 172, p. 585–586, 1971.

GILBERT, L. E. Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plants. In L. E. Gilbert & P. H. Raven (Eds.), **Coevolution of animals and plants** (pp. 210–240, 1975). Austin and London: University of Texas Press.

Gilbert, L. E. Postmating female odor in *Heliconius* butterflies: a male contributed anti-aphrodisiac? **Science**, v. 193, p. 419–420, 1976.

GILBERT, L. E. The coevolution of a butterfly and a vine. *Sci Am* 247:102–107, 1982.

GRANT, G. G.; BRADY, U. E. Courtship behavior of phycitid moths: Comparison of *Plodia interpunctella* and *Cadra cautella* and role of male scent glands. **Canadian Journal of Zoology**, v. 53, p. 813–826, 1975.



GRÖNING, J.; HOCHKIRCH, A. Reproductive interference between animal species. **The Quarterly Review of Biology**, n.83, v.3, p. 257-282, 2008.

GROSS, F. J. Beitrag zur Systematik von *Pseudochazara*-Arten (Lep., Satyridae). **Atalanta Wurzburg**, v. 9, p. 41-103, 1978.

HAPP, G. Multiple sex pheromones of the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* L. **Nature**, v. 222, p. 180-181, 1969.

HARTLIEB, E.; ANDERSON, P. Olfactory-released behaviours. In: **Insect olfaction** (ed. B. S. Hanson), pp. 315-349, Berlin, Germany: Springer, 1999.

HARTMANN, T.; OBER, D. Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. In: **Topics in current chemistry: biosynthesis: Aromatic polyketides, isoprenoids, alkaloids**. Springer, Berlin, pp. 207-243, 2000.

HATANO, E.; SAVEER, A. M.; BORRERO-ECHEVERRY, F.; STRAUCH, M.; ZAKIR, A.; BENGTSSON, M.; IGNELL, R.; ANDERSON, P.; BECHER, P. G.; WITZGALL, P.; DEKKER, T. An herbivore-induced plant volatile interferes with host plant and mate location in moths through suppression of olfactory signalling pathways. **BMC Biology**, n. 13, p. 75, 2015.

HEDENSTRÖM, E.; WALLIN, E. A.; ANDERSSON, J.; BÄNG, J.; WANG, H. L.; LÖFSTEDT, C.; BRATTSTRÖM, O.; BAQUET, P. Stereoisomeric analysis of 6,10,14-trimethylpentadecan-2-ol and the corresponding ketone in wing extracts from African *Bicyclus* butterfly species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 41, p. 44-51, 2015.

HEGDE, M.; OLIVEIRA, J. N.; DA COSTA, J. G.; BLEICHER, E.; SANTANA, A. E. G.; BRUCE, T. J. A.; CAULFIELD, J.; DEWHIRST, S. Y.; WOODCOCK, C. M.; PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A. Identification of semiochemicals released by cotton, *Gossypium hirsutum*, upon infestation by the cotton aphid, *Aphis gossypii*. **Journal of Chemical Ecology**, n. 37, v. 7, p. 741-750, 2011.

HEIL, M. Indirect defence via tritrophic interactions. **New Phytologist**, v. 178, p. 41-61, 2008.

HEINBOCKEL, T.; KAISLING, K. E. Variability of olfactory receptor neuron responses of female silkmths (*Bombyx mori* L.) to benzoic acid and (+)-linalool. **Journal of Insect Physiology**, v. 42, p. 565-578, 1996.

HILKER, M.; MEINERS, T. Early herbivore alert: insect eggs induce plant defense. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, p. 1379-1397, 2006.

HOLZINGER, H.; HOLZINGER, R. *Heliconius* and related genera. Venette, **Sciences Naturelles**, p. 328, 1994.

HOPKE, J.; DONATH, J.; BLECHERT, S.; BOLAND, W. Herbivore-induced volatiles – the emission of acyclic homoterpenes from leaves of phaseolus-lunatus and zea-mays can be triggered by a beta glucosidase and jasmonic acid. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, n. 352, v. 2, p. 146-150, 1994.

HORAS, V. R.; SILVA, M. A. N.; ANNIES, V.; MAIA, B. H. L. N. S.; MARQUES, F. A.; SILVA, M. F. G. F. Noctuidae- induced plant volatiles: current situation and prospects. **Química Nova**, n. 37, v. 10, p. 1663-1669, 2014.

HUIGENS, M. E., WOELKE, J. B., PASHALIDOU, F. G., BUKOVINSZKY, T., SMID, H. M. & FATOUROSA, N. E. Chemical espionage on species-specific butterfly anti-

aphrodisiacs by hitchhiking *Trichogramma* wasps. **Behavioral Ecology**, v. 21, p. 470–478, 2010.

IMBISCUSO, G.; TROTTA, A.; MAFFEI, M.; BOSSI, S. Herbivory induces a ROS burst and the release of volatile organic compounds in the fern *Pteris vittata* L. **Journal of Plant Interactions**, n. 1, v. 4, p. 15–22, 2009.

IRMISCH, S.; JIANG, Y.; CHEN, F.; GERSHENZON, J.; KÖLLNER, T. G. Terpene synthases and their contribution to herbivore-induced volatile emission in western balsam poplar (*Populus trichocarpa*). **BMC Plant Biology**, v. 14, p. 270, 2014.

IYENGAR, V. K., ROSSINI, C. & EISNER, T. Precopulatory assessment of male quality in an arctiid moth (*Uthetiesa ornatix*): hydroxydanaidal is the only criterion of choice. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 49, 283–288, 2001.

JARDIM, B. C.; BERBERT-MOLINA, M. A.; RODRIGUES, D. C.; BOTELHO-JÚNIOR, S.; VICENTE, A. C.; HANSEN, E.; OTSUKI, K.; URMËNYI, T. P.; JACINTO, T. Herbivore response in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) plants: induction of lipoxygenase activity in leaf tissue in response to generalist and specialist insect attack. **Protein & Peptide Letters**, n. 17, v. 4, p. 480–484, 2010.

Kaissling, K. E.; Kasang, G.; Bestmann, H. J.; Stransky, W.; Vostrowsky, O. A new pher-omone of the silkworm moth *Bombyx mori*. **Naturwissenschaften**, v. 65, p. 382–384, 1978.

KAMINSKI, L. A.; DELL'ERBA, R.; MOREIRA, G. R. P. Morfologia externa dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais: VI. *Dione moneta moneta* Hübner (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, p. 13–23, 2008.

KANT, M. R.; AMENT, K.; SABELIS, M. W.; HARING, M. A.; SCHUURINK, R. C. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. **Plant Physiology**, n. 135, v. 1, p. 483–495, 2004.

KAPPERS, I. F.; AHARONI, A.; VAN HERPEN, T. W. J. M.; LUCKERHOFF, L. L. P.; DICKE, M.; BOUWMEESTER, H. J. Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. **Science**, n. 309, v. 5743, p. 2070–2072, 2005.

KARIYAT, R. R.; MAUCK, K. E.; BALOGH, C. M.; STEPHENSON, A. G.; MESCHER, M. C.; DE MORAES, C. M. Inbreeding in horsenette (*Solanum carolinense*) alters night-time volatile emissions that guide oviposition by *Manduca sexta* moths. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 280, p. 20130020, 2017.

KASANG, G.; KAISLING, K. E.; VOSTROWSKY, O.; BESTMANN, H. J. Bombykal, a second pheromone component of the silkworm moth *Bombyx mori*. L. **Angewandte Chemie**, v. 90, p. 74–75, or **Angewandte Chemie International Edition England**, v. 17, p. 60, 1978b.

KASANG, G.; SCHNEIDER, D., SCHÄFER, W. The silkworm moth *Bombyx mori*. Presence of the (*E,E*)-stereoisomer of bombykol in the female pheromone gland. **Naturwissenschaften**, v. 65, p. 337–338, 1978a.

KASK, K.; KÄNNASTE, A.; NIINEMETS, Ü. Emission of volatile organic compounds as a signal of plant stress. **Scientific Bulletin of ESCORENA**, v. 8, p. 79–93. 2013.

KLEIN, A. L. & ARAÚJO, A. M. Courtship behavior of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae) towards virgin and mated females: conflict between attraction and repulsion signals? **Journal of Ethology**, 28, 409–420, 2010.

- KLEIN, A. L.; ARAUJO, A. M. Courtship behavior of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae) towards virgin and mated females: conflict between attraction and repulsion signals. **Journal of Ethology**, v. 28, p. 409–420, 2010.
- KOLLNER, T. G.; HELD, M.; LENK, C.; HILTPOLD, I.; TURLINGS, T. C. J.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. A maize (*E*)-beta-caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most american maize varieties. **Plant Cell**, n. 20, v. 2, p. 482–494, 2008.
- KRISTENSEN, N. P. & SIMONSEN, T. J. Hairs and scales. In Kristensen NP, Simonsen TJ (eds), **Lepidoptera, moths and butterflies**, (Handbook of Zoology, IV/36, Vol. 2: Morphology, physiology, and development, pp 9–22). Berlin and New York: Walter de Gruyter, 2003.
- KUKUK, P. Evidence for an anti-aphrodisiac in the sweat bee *Lasioglossum zephyrum* (Dialictus). **Science**, v. 227, p. 656–657, 1985.
- KYRIACOU, C. P. Behavioural genetics: sex, flies and acetate. **Nature**, v. 446, p. 502–504. 2007.
- LARSDOTTER-MELLSTROM, H.; ERIKSSON, K.; JANZ, N.; NYLIN, S.; CARLSSON, M. A. Male butterflies use an anti-aphrodisiac pheromone to tailor ejaculates. **Functional Ecology**, v. 30, p. 255–261, 2016.
- LARSEN, T. B. **Butterflies of West Africa**. Stenstrup, Denmark: Apollo Books, 2005.
- LEITE, L. A. R.; CASAGRANDE, M. M.; MIELKE, O. H. H. External morphology of the adult of *Heraclides anchisiades capys* (Hübner, [1809]) (Lepidoptera – Papilionidae). I. Head, cephalic appendages and cervical region. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 1119–1126, 2010.
- LEPPIK, E.; TAMMARU, T.; FRÉROT, B. A view of diel variation of maize odorscape. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p.811–820, 2014.
- LIÉNARD, M. A.; WANG, H.-L.; LASSANCE, J-M; LÖFSTEDT, C. Sex pheromone biosynthetic pathways are conserved between moths and butterfly *Bicyclus anynana*. **Nature Communications**, v. 5, p. 3957, 2014.
- MACORIS, M. S.; JANZANTTI, N. S.; GARRUTI D. dos S.; MONTEIRO, M. Volatile compounds from organic and conventional passion fruit (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) pulp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 31, v. 2, p. 430–435, 2011.
- MANN, F., VANJARI, S., ROSSER, N., MANN, S., DASMAHAPATRA, K. K., CORBIN, C., LINARES, M., PARDO-DIAZ, C., SALAZAR, C., JIGGINS, C. & SCHULZ, S. The scent chemistry of *Heliconius* wing androconia. **Journal of Chemical Ecology**, n. 43, v. 9, p. 843–857, 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28791540>
- MARTINS, C. B. C.; VIDAL, D. M.; GOMES, S. M. S.; ZARBIN, P. H. G. Volatile organic compounds (VOCs) emitted by *Ilex paraguariensis* plants are affected by the herbivory of the lepidopteran *Thelosia camina* and the coleopteran *Hedypathes betulinus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2016. <http://doi:10.21577/0103-5053.20160279>
- MARTINS, C. B. C.; ZARBIN, P. H. G. Volatile organic compounds of conspecific-damaged *Eucalyptus benthamii* influence responses of mated females of *Thaumastocoris peregrinus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p. 602–611, 2013. <http://doi:10.1007/s10886-013-0287-y>

MEINWALD, J.; MEINWALD, Y. C.; MAZZOCHI, P. H. Sex pheromone of the queen butterfly: chemistry. **Science**, v. 164, p. 1174-1175, 1969.

MEINWALD, J.; MEINWALD, Y. C.; WHEELER, J. W.; EISNER, T.; BROWER, L. P. Major components in the exocrine secretion of a male butterfly (*Lycorea*). **Science**, v. 151, p. 583-585, 1966.

MIYAKADO, M.; MEINWALD, J.; GILBERT L. E. (R)-(Z, E)-9, 11-Octadecadien-13-olide: An intriguing lactone from *Heliconius pachinus* (Lepidoptera). **Experientia**, v. 45, p. 1006, 1989. <https://doi.org/10.1007/BF01953063>

MOORE, M. E. **Wing scale morphology of a sexually dimorphic color pattern element in the butterfly co-mimics *Heliconius melpomene* and *Heliconius erato***. Bachelor of Arts Honors Thesis; Faculty of Mount Holyoke College, South Hadley, Massachusetts, 2014.

MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; PAREJA, M.; SERENO, F. T. P. S.; MICHEREFF, M. F. F.; BIRKETT, M. A.; PICKETT, J. A.; BORGES, M. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with cis-jasmone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 131, p. 178–188, 2009.

MÜLLER, F. IX. The “Maracujá (or Passion-flowers) butterflies”, p. 651–667. In: Longmans, Green, and Co (Eds.). **Butterfly-hunting in many lands**. G. B. Longstaff, London, 729p, 1912.

MYERS, J. Pheromones and courtship behavior in butterflies. **American Zoologist**, v. 12, p.545–551, 1972.

NIEBERDING, C. M., DE VOS, H., SCHNEIDER, M. V., LASSANCE, J., ESTRAMIL, N., ANDERSSON, J., BANG, J., HEDENSTRÖM, E., LOFSTEDT, C. & BRAKEFIELD, P. M. The male sex pheromone of the butterfly *Bicyclus anynana*: towards an evolutionary analysis. **Public Library of Science**, one, v. 3, p. e2751, 2008.

NIEBERDING, C. M.; FISCHER, K.; SAASTAMOINEN, M.; ALLEN, C. E.; WALLIN, E. A.; HEDENSTRÖM, E.; BRAKEFIELD, P. M. Cracking the olfactory code of a butterfly: the scent of ageing. **Ecology Letters**, v. 15, 2012.

NIEDERBACHER, B.; WINKLER, J. B.; SCHNITZLER, J. P. Volatile organic compounds as non-invasive markers for plant phenotyping. **Journal of the Society of Experimental Botany**, n. 18, v. 66, p. 5403–5416, 2015.

NISHIDA, R.; KIM, C. S.; FUKAMI, H.; IRIK, R. Ideamine N-Oxides: Pyrrolizidine alkaloids sequestered by the danaine butterfly, *Idea leuconoe*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, p. 1787-1792, 1991.

NISHIDA, R.; SCHULZ, S.; KIM, C. S.; FUKAMI, H., KUWAHARA, Y.; HONDA, I. K.; HAYASHI, N. Male sex pheromone of a giant danaine butterfly, *Idea leuconoe*. **Journal of Chemical Ecology**, n. 22, v. 5, p. 949-72, 1996.

NOIROT, C., QUENNEDEY, A. Fine structure of insect epidermal glands. **Annual Review of Entomology**, v. 19, p. 61–80, 1974.

OBARA, Y. Mating behaviour of the cabbage white, *Pieris rapae crucivora* II: the “mate-refusal” posture of the female. **Zoologisches Magazin**, v. 73, p. 175-178, 1964.

OCKENFELS, P., BOPPRÉ, M., FISCHER, O. W. & SCHULTZ, S. **Chemical Communication in the Silver-Washed Fritillary, *Argynnis paphia* (Lepidoptera:**



**Nymphalidae: Heliconiinae).** Poster from 15th Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology, 1998. <http://www.chemecol.org/meetings/98/posters.html>

OKUMURA Y, OZEKI Y, ITOH T, OHTA S, ÔMURA H (2016) Volatile terpenoids from male wings lacking scent scales in *Anthocharis scolymus* (Lepidoptera: Pieridae). **Applied Entomology And Zoology**,

OLIVEIRA, M. A. D. E.; GOMES C. F. F.; PIRES, E. M.; MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M. C. Bioindicadores ambientais: insetos como um instrumento desta avaliação. **Revista Ceres**, v. 61, supl. Viçosa, Nov./Dec., 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201461000005>

OLIVEIRA, Z. P. **A cultura do maracujazeiro: práticas de cultivo.** Maceió: **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Alagoas**, v. 1, p. 25, 1989.

OLUWAFEMI, S.; BIRKETT, M. A.; CAUFIELD, J.; PICKETT, J. A. Variability of volatile organic compounds emitted by seedlings of seven African maize varieties when infested by adult *Cicadulina storeyi* china leafhopper vectors of maize streak virus. **The African Crop Science Journal**, n. 2, v. 20, p. 117–124, 2012.

ORR, A. G.; TRIGO, J. R.; WITTE, L.; HARTMANN, T. Sequestration of pyrrolizidine alkaloids by larvae of *Tellervo zoilus* (Lepidoptera: Ithomiinae) and their role in the chemical protection of adults against the spider *Nephila maculata* (Araneidae). **Chemoecology**, v. 7, p. 68–73, 1996.

PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. H. plant volatiles as a defense against insect herbivores. **Plant Physiology**, v. 121, p. 325–331, 1999.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 237–243, 2002.

PIERIK, R.; BALLARÉ, C. L.; DICKE, M. Ecology of plant volatiles: taking a plant community perspective. **Plant, Cell & Environment**, n. 37, p. 1845–1853, 2014.

PINTO-ZEVALLOS, D. M. P.; MARTINS, C. B. C.; PELLEGRINO, ZARBIN A. C.; P. H. G. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**, n. 36, v. 9, p. 1395-1405, 2013.

PIVNICK, K. A.; LAVOIEDORINIK, J., MCNEIL, J. N. The role of the androconia in the mating behavior of the European skipper, *Thymelicus lineola*, and evidence for a male sex-pheromone. **Physiological Entomology**, v. 17, p. 260–268, 1992.

PLISKE, T. E. Courtship behavior of the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 68, p. 143-151, 1974.

PLISKE, T. E.; EDGAR, J.A.; CULVENOR, C. C. J. The chemical basis of attraction of Ithomiine butterflies to plants containing pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Chemical Ecology**, n. 3, v. 2, p. 255–262, 1976.

PLISKE, T. E.; EISNER, T. Sex pheromone of the queen butterfly: biology. **Science**, v. 154, p. 1170-1172, 1969.

PLISKE, T. E.; SALPETER M. M. The structure and development of the hairpencil glands in males of the queen butterfly, *Danaus gilippus berenice*. **Journal of Morphology**, v. 134, p. 215–242, 1971.

PONTES, M.; MARQUES, J. C.; CÂMARA, J. S. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometric methodology for

the establishment of the volatile composition of *Passiflora* fruit species. **Microchemical Journal**, v. 93, p. 1–11, 2009.

PRICE, P. W. **Insect Ecology**. New York, Wiley-Interscience, p. 607, 1984.

PRICE, P. W.; BOUTON, C. E.; GROSS, P.; MCPHERON, B. A.; THOMPSON, J. N.; WEIS, A. E. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. **The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 11, p. 41–65, 1980.

PRIESNER, E. Progress in the analysis of pheromone receptor systems. **Annales de Zoologie Ecologie Animale**, v. 11, p. 533–546, 1979.

PRUDIC, K. L.; JEON C, CAO, H.; MONTEIRO, A. Developmental plasticity in sexual roles of butterfly species drives mutual sexual ornamentation. **Science**, v. 331, n. 73, 2011.

R DEVELOPMENT CORE TEAM R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, 2016. <http://www.R-project.org/Rangel>

RAMOS, R. R.; FREITAS A. V. L. Population biology and wing color variation in *Heliconius erato phyllis* (Nymphalidae). **Journal of the Lepidopterists' Society**, N. 53, v. 1, p. 11–21, 1999.

RANGEL, M.; MACHADO, O. L. T.; DA CUNHA, M.; JACINTO, T. Accumulation of chloroplast-targeted lipoxygenase in passion fruit leaves in response to methyl jasmonate. **Phytochemistry**, v. 60, p. 619–625, 2002.

RASMANN, S.; KÖLLNER, T. G.; DEGENHARDT, J.; HILTPOLD, I.; TOEPFER, S.; KUHLMANN, U.; GERSHENZON, J.; TURLINGS, T. C. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. **Nature**, v. 434, n. 7034, p. 732–7, 2005.

RAUSER, C. L. & RUTOWSKI, R. L. Male-specific structures on the wings of the Gulf Fritillary butterfly, *Agraulis vanillae* (Nymphalidae). **Journal of the Lepidopterists' Society**, v. 57, p. 279–283, 2003.

REGINATO, M.; MATOS, F. B.; LINDOSO, G. DA S.; DE SOUZA, C. M. F.; PREVEDELLO, J. A.; MORAIS, J. W.; EVANGELISTA, P. H. L. A vegetação na Reserva Mata Viva, Curitiba, Paraná, Brasil. **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, n. 37, v. 3 e 4, p. 229–252, 2008.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208–212, 1963.

ROBERTSON, K. A.; MONTEIRO, A. Female *Bicyclus anynana* butterflies choose males on the basis of their dorsal UV-reflective eyespot pupils. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 272, p. 1541–1546, 2005.

ROSS, G. N., FALES, H. M., LLOYD, H. A., JONES, T., SOKOLOSKI, E. A., MARSHALL-BATTY, K. & BLUM, M. S. Novel chemistry of abdominal defensive glands of Nymphalid butterfly *Agraulis vanillae*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, p. 1219–1228, 2001.

ROSS, P.; CREWS, D. (1977) Influence of the seminal plug on mating behavior in the garter snake. **Nature**, v. 267, p. 344–345, 1977.

ROSSER, N.; PHILLIMORE, A. B.; HUERTAS, B.; WILLMOTT, K. R.; MALLET, J. Testing historical explanations for gradients in species richness in heliconiine species of tropical America. *Biological Journal of the Linnean Society*, n. 105, p. 479-497, 2012.

ROSSETTO, C. J.; CAVALCANTE, R. D.; GRISI JÚNIOR, C.; CARVALHO, A. M. Insetos do maracujazeiro, *Passiflora* spp. In: **Simpósio sobre a cultura do maracujá**, n. 1, Campinas, Anais, SBF/CATI, 1974.

RUTOWSKI, R. L. Male scent-producing structures in *Colias* butterflies: function, localization, and adaptive features. *Journal of Chemical Ecology*, v. 6, p. 13-26, 1980.

RUTOWSKI, R. L. Sexual selection and the evolution of butterfly mating behaviour. *Journal of Research on the Lepidoptera*, v. 23, p. 125-142, 1984.

SCHNEIDER, D.; SCHULZ, S.; PRIESNER, E.; ZIESMANN, J.; FRANCKE, W. Autodetection and chemistry of female and male pheromone in both sexes of the tiger moth *Panaxia quadripunctaria*. *Journal of Comparative Physiology A*, v. 182, p. 153-161, 1988.

SCHOONHOVEN, L.; VAN LOON, J.; DICKE, M. **Insect-Plant Biology**. Oxford, University Press, p. 421, 2005.

SCHULZ, S. Absolute configuration and synthesis of 2-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-3-methyl-butyrolactone, a presumed pheromone of ithomiine butterflies. *Liebigs Annalen der Chemie*, p. 829-834, 1992.

SCHULZ, S.; BECCALONI, G.; BROWN J. R., K. S.; BOPPRÉ, M.; FREITAS, A. V. L.; OCKENFELS, P.; TRIGO, J. R. Semiochemicals derived from pyrrolizidine alkaloids in male ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 32, p. 699-713, 2004.

SCHULZ, S.; BOPPRÉ, M.; VANE-WRIGHT, R. I. Specific mixtures from secretions of male sex scent-organs of African Milkweed butterflies (Danainae). *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 342, p. 161-181, 1993.

SCHULZ, S.; ESTRADA, C.; YILDIZHAN, S.; BOPPRÉ, M.; GILBERT, L. E. An anti-aphrodisiac in *Heliconius melpomene* butterflies. *Journal of Chemical Ecology*, v. 34, p. 82-93, 2008.

SCHULZ, S.; FRANCKE, W.; EDGAR, J. A.; SCHNEIDER, D. Volatile compounds from androconial organs of danaine and Ithomiine butterflies. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 43c, p. 99-104, 1988.

SCHULZ, S.; NISHIDA, R. The pheromone system of the male danaine butterfly, *Idea leucone*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 4, p. 341-349, 1996.

SCHULZ, S.; YILDIZHAN, S.; STRITZKE, K.; ESTRADA, C.; GILBERT, L. E. Macrolides from the scent glands of the tropical butterflies *Heliconius cydno* and *Heliconius pachinus*. *Organic and Biomolecular Chemistry*, n. 5, v. 21, p. 3434-3441, 2007.

SCHULZ, S.; YILDIZHAN, S.; STRITZKE, K.; ESTRADA, C.; GILBERT, L.E. Macrolides from the scent glands of the tropical butterflies *Heliconius cydno* and *Heliconius pachinus*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, n. 5, v. 21, p. 3434-3441, 2007.

SCOBLE, M. J. **The Lepidoptera: Form, Function and Diversity**. Oxford University Press, p. 404, 1992.

SCOTT, D. Sexual mimicry regulates the attractiveness of mated *Drosophila melanogaster* females. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p. 8429–8433, 1986.

SCOTT, J. A. Mating of butterflies. **Journal of Research on the Lepidoptera**, v. 11, p. 9–127, 1972.

SEIDELMANN, K. The courtship-inhibiting pheromone is ignored by female-deprived gregarious desert locust males. **Biology Letters**, v. 2, p. 525–527, 2006.

SELLIER, R. Etude morphologique en microscopie électronique à balayage de quelques types d'androcoïnes alaires chez les Lépidoptères diurnes. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences Paris**, v. 273, p. 2550–2553, 1971.

SELLIER, R. Etude ultrastructurale en microscopie électronique à balayage et essai d'interprétation du mode de fonctionnement des poils androconiaux alaires chez les HesperIIDae (Lepidoptera Rhopalocera). **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, v. 275, p. 2239–2242, 1972.

SHUSTER, S. M. Sexual selection and mating systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, p. 10009–10016, 2009.

SILVA, A. G.; SOUZA B. H. S.; RODRIGUES N. E. L.; BOTTEGA D. B., BOIÇA JUNIOR A. L. Interação tritrófica: aspectos gerais e suas implicações no manejo integrado de pragas. **Nucleus**, n. 9, p. 1, 2012.

SILVA, A. K.; GONCALVES, G. L.; MOREIRA, G. R. P. Larval feeding choices in heliconians: induced preferences are not constrained by performance and host plant phylogeny. **Animal Behaviour**, n. 89, p. 155–162, 2014.

SMILEY, J. T. Are chemical barriers necessary for evolution of butterfly-plant associations? **Oecologia**, v. 65, p. 580–583, 1985a.

SMILEY, J. T. *Heliconius* caterpillar mortality during establishment on plants with and without attending ants. **Ecology**, v. 66, p. 845–849, 1985b.

SOURAKOV, A. Pupal mating in Zebra longwing (*Heliconius charithonia*): Photographic evidence. **News of the Lepidopterists Society**, v. 50, p. 26–32, 2008.

SPENCER, K. C. Chemical mediation of coevolution in the *Passiflora-Heliconius* interaction, 167–240. In: Spencer KC (ed) **Chemical mediation of evolution**. Academic Press Inc, San Diego, p 609p, 1988.

STEINBRECHT, R. A. Feinstruktur und Histochemie der Sexualduftdrüse des seidenspinners *Bombyx mori*. **Zeitschrift für Zellforschung**, v. 64, p. 227–261, 1964.

STRITZKE, K.; SCHULZ, S.; NISHIDA, R. Absolute configuration and synthesis of b- and d-lactones present in the pheromone system of the giant white butterfly *Idea leuconoe*. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 22, v. 2002, p. 3699–3892, 2002.

SUN, Z.; LIU, Z.; ZHOU, W.; JIN, H.; LIU, H.; ZHOU, A.; ZHANG, A.; WANG, M-Q. Temporal interactions of plant - insect - predator after infection of bacterial pathogen on rice plants. **Scientific Reports**, v. 6, p. 26043, 2016. <http://doi:10.1038/srep26043>

TINBERGEN, N., MEEUSE, B. J. D., BOEREMA, L. K. & VAROSSIEAU, W. W. Die balz des samtfalters, *Eurema* (= *Satyrus*) *semele*. **Zeitschrift für Tierpsychologie**, v. 5, p. 182–226, 1942.



TRIGO, J. R.; BARATA, L. E. S.; BROWN, K. S. Stereochemical inversion of pyrrolizidine alkaloids by *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae): Specificity and evolutionary significance. **Journal of Chemical Ecology**, n. 20, v. 11p. 2883-99, 1994.

TRIGO, J. R.; BROWN, K. S. Variation of pyrrolizidine alkaloids in Ithomiinae: a comparative study between species feeding on Apocynaceae and Solanaceae. **Chemoecology**, n. 1, v. 1, p. 22–29, 1990.

TRIGO, J. R.; BROWN, K. S.; HENRIQUES, S. A.; BARATA, L. E. S. Qualitative patterns of pyrrolizidine alkaloids in Ithomiinae butterflies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, p. 181–188, 1996.

TUZOV, V. K. (Ed.) **Guide to the butterflies of russia and adjacent territories.I. HesperIIDae, PapilionIDae, PierIDae, Satyridae**. Sofia. 480 pp., 1997.

VAN BERGEN, E.; BRAKEFIELD, P. M.; HEUSKIN, S.; ZWAAN, B. J.; NIEBERDING, C. M. The scent of inbreeding: a male sex pheromone betrays inbred males. **Proceedings of the Royal Society**, v. 280, p. 20130102, 2013.

VANE-WRIGHT, R. I.; BOPPRE, M. Visual and chemical signaling in butterflies: functional and phylogenetic perspectives. **Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences**, v. 340, p. 197–205, 1993.

WAHLBERG, N.; BROWER, A. V. Z. **The Tree of Life Web Project, Nymphalidae, Rafinesque 1815**. Brush-footed butterflies, 2009. Disponível em <http://tolweb.org/Nymphalidae/12172/2009.09.15> Acesso em 27/09/2017.

WAKEHAM-DAWSON, A. Discriminant analysis of androconia in the genus *Pseudochazara* de Lesse, 1951 (Lepidoptera; Satyridae). **Entomologist's Gazette**, v. 48, p. 37–46, 1997.

WALLING, L. L. The myriad plant responses to herbivores. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 19, p. 195–216, 2000.

WALTERS, J. R.; STAFFORD, C.; HARDCASTLE, T. J.; JIGGINS, C. D. Evaluating female remating rates in light of spermatophore degradation in *Heliconius* butterflies: Pupal-mating monandry versus adult-mating polyandry. **Ecological Entomology**, v. 37, p. 257–268, 2012..

WANG, H.-L., BRATTSTRÖM, O., BRAKEFIELD, P. M., FRANCKE W. & LÖFSTEDT, C. Identification and biosynthesis of novel male specific esters in the wings of the tropical butterfly, *Bicyclus martius sanaos*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, p. 549–559, 2014. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10886-014-0452-y>

WAR, A. R.; SHARMA, H. C.; PAULRAJ, M. G.; WAR, M. Y.; IGNACIMUTHU, S. Herbivore induced plant volatiles Their role in plant defense for pest management. **Plant Signaling & Behavior**, n. 6, v. 12, p. 1973–1978, 2011.

WASSERTHAL, L. T. & WASSERTHAL W. Ultrastructure of a scent scale organ with pressure discharge in male *Caligo eurilochus brasiliensis* (Fldr.) (Lepidoptera: Brassolidae). **Cell and Tissue Research**, n. 177, v. 9, p. 87–103, 1977.

WIKLUND, C.; FORSBERG, J. Courtship and male discrimination between virgin and mated females in the orange tip butterfly, *Anthocharis cardamines*. **Animal Behavior**, v. 34, p. 328-332, 1985.

WILLIS, A. A.; BIRCH, M. C. Male lek formation and female calling in a population of the arctiid moth, *Estigmene acrea*. **Science**, v. 218, p. 168–170, 1968.

WILLIAMS, K. S.; GILBERT, L. E. Insects as selective agents on plant vegetative morphology: egg mimicry reduces egg laying by butterflies. **Science**, v. 212, p. 467, 1981.

WU, J. Q.; BALDWIN, I. T. Herbivory-induced signalling in plants: perception and action. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, p. 1161–1174, 2009.

WUNDERER, H.; HANSEN, K.; BELL, T. W.; SCHNEIDER, D.; MEINWALD, J. Sex pheromones of two Asian moths (*Cretonotos transiens*, *C. gangis*; Lepidoptera—Arctiidae): behavior, morphology, chemistry and electrophysiology. **Experimental Biology**, v. 46, p. 11–27, 1986.

WYATT, T. D. **Pheromones and Animal Behaviour**. New York, NY:Cambridge University Press, 2003.

YU, H.; ZHANG, Y.; WU, K.; GAO, X. W.; GUO, Y. Y. Field-testing of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects. **Environmental Entomology**, n. 37, v. 6, p. 1410–1415, 2008.

ZAKIR, A.; SADEK, M. M.; BENGTSSON, M.; HANSSON, B. S.; WITZGALL, P.; ANDERSON, P. Herbivore-induced plant volatiles provide associational resistance against an ovipositing herbivore. **Journal of Ecology**, v. 101, p. 410–417, 2013. <http://doi:10.1111/1365-2745.12041>

ZARBIN, P. H. G. **Ecologia química e o sistema de interação na natureza**. 2014. Disponível em <https://www.youtube.com/watch?v=QeXYi5HZXIs>. Acessado em 18/09/2108.

ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA J. T. B.; LEAL W. S. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Química Nova**, n. 22, p. 263–268, 1999.

ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA, J. T. B.; LEAL, W. S. General methodologies employed on the isolation and structural identification of insects pheromones. **Química Nova**, v. 22, p. 263–268, 1999.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Insect pheromones: technology and challenges for a competitive agriculture in Brazil. **Química Nova**, v. 32, p. 722–731, 2009.

ZHANG, Q. H.; ALDRICH, J. R. Male-produced anti-sex pheromone in a plant bug. **Naturwissenschaften**, v. 90, p. 505–508, 2003.

ZIESMANN, J; VALTEROVA, I; HABERKORN, K; DE BRITO SANCHEZ. M. G., KAISLING, K. E. Chemicals in laboratory room air stimulate olfactory neurons of female *Bombyx mori*. **Chemical Senses**, v. 25, p. 31–37, 2000.

## APÊNDICE 1 – TABELAS COMPLEMENTARES

TABELA 5 - Quantificação dos compostos presentes na faixa de sobreposição das asas de *Heliconius erato phyllis*

Nº	Asa Anterior - ME			Asa Posterior - ME			Asa Anterior - MNE			Asa Posterior - MNE		
	Média	Frequência Relativa (%)	EP	Média	Frequência Relativa (%)	EP	Média	Frequência Relativa (%)	EP	Média	Frequência Relativa (%)	EP
1	2380,49	8,42	1552,51	5061,96	25,38	2823,51	87,36	3,58	58,26	827,00	14,47	329,44
2	139,76	0,49	52,57	618,842	3,10	283,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	166,99	0,59	114,89	367,152	1,84	160,61	0,00	0,00	0,00	61,60	1,08	21,53
6	627,04	2,22	214,71	1814,86	9,10	1046,13	0,00	0,00	0,00	448,86	7,85	259,15
8	729,49	2,58	654,02	420,70	2,11	278,23	206,85	8,49	70,84	179,75	3,14	81,20
9	2652,25	9,38	1874,85	2766,26	13,87	2609,91	0,00	0,00	0,00	774,99	13,56	365,06
11	8884,06	31,43	7645,00	3747,61	18,79	2704,00	986,42	40,47	393,99	2672,97	46,76	1386,77
12	7577,93	26,81	6513,36	2030,43	10,18	1293,17	1156,53	47,45	515,18	750,72	13,13	216,66
14	5110,62	18,08	4590,93	3113,97	15,62	1972,74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Soma	28268,63	100,00	19941,8	19941,8	100,00	100,00	2437,16	100,00	5715,89	100,00	100,00	100,00

ME = Macho excitado, MNE = macho não excitado, EP = erro padrão.

FONTE: O autor (2018).

TABELA 6 - Quantificação dos compostos presentes na faixa de sobreposição das asas de *Heliconius ethilla narcaea*

Nº	Asa Anterior - ME			Asa Posterior - ME			Asa Anterior - MNE			Asa Posterior - MNE		
	Média	Frequência Relativa (%)	EP	Média	Frequência Relativa (%)	EP	Média	Frequência Relativa (%)	EP	Média	Frequência Relativa (%)	EP
3	198,36	12,96	81,61	574,87	14,31	138,64	287,31	7,90	85,15	989,40	12,38	216,30
4	47,28	3,09	22,17	87,23	2,17	5,71	26,66	0,73	5,99	68,19	0,85	10,44
6	23,12	1,51	8,68	54,14	1,35	9,91	554,62	15,25	157,82	1631,44	20,41	414,32
7	497,01	32,48	208,30	1337,86	33,31	292,16	766,30	21,06	174,03	2299,31	28,76	453,53
8	200,14	13,08	83,28	563,64	14,03	178,92	318,41	8,75	120,35	1056,66	13,22	275,04
10	47,27	3,09	13,01	101,27	2,52	31,77	62,41	1,72	12,37	205,85	2,57	43,07
12	62,48	4,08	31,41	312,44	7,78	104,96	133,44	3,67	36,76	566,08	7,08	154,25
13	14,58	0,95	5,64	19,37	0,48	4,79	26,85	0,74	2,53	31,83	0,40	1,22
15	102,55	6,70	56,19	111,32	2,77	50,71	163,53	4,49	27,48	167,69	2,10	23,77
Soma	1530,14	100,00	4016,39	4016,39	100,00	100,00	3638,04	100,00	7995,00	100,00	100,00	100,00

ME = Macho excitado, MNE = macho não excitado, EP = erro padrão

FONTE: O autor (2018).

TABELA 7 - Quantificação dos compostos presentes na faixa de sobreposição das asas de *Heliconius besckei*

Nº	Asa Anterior - ME			Asa Posterior - ME				
	Média	Frequencia Relativa (%)	n	EP	Média	Frequencia Relativa (%)	n	EP
4	184,13	31,77	2	32,70	216,02	39,18	2	45,73
6	105,51	18,20	2	21,29	41,65	7,55	2	8,84
12	37,31	6,44	2	18,61	23,52	4,26	2	23,52
13	222,54	38,39	2	14,15	227,79	41,31	2	42,82
15	30,15	5,20	2	12,04	42,43	7,69	2	30,75
Soma	579,64	100,00			551,39			100,00

ME = Macho excitado, EP = erro padrão

FONTE: O autor (2018).

TABELA 8 - Quantificação dos compostos presentes na faixa de sobreposição das asas de *Heliconius besckei*

Nº	Asa Anterior - MNE			Asa posterior - MNE				
	Média	Frequencia Relativa (%)	n	EP	Média	Frequencia Relativa (%)	n	EP
4	262,74	28,81	4	43,38	365,88	42,90	4	54,17
6	159,37	17,48	4	17,76	81,28	9,53	4	35,61
12	124,03	13,60	4	9,27	93,76	10,99	4	35,25
13	204,51	22,43	4	8,28	204,74	24,01	4	16,86
15	161,18	17,68	4	45,02	107,11	12,56	4	36,21
Soma	911,83	100			852,765			100

MNE = macho não excitado, EP = erro padrão

FONTE: O autor (2018).

TABELA 9 - Quantificação dos compostos bioativos presentes glândula odorífera abdominal de *Heliconius erato phyllis*

Nº	Macho não acasalado			Macho acasalado			Fêmea acasalada		
	Média (ng)	Frequência Relativa (%)	EP	Média (ng)	Frequência Relativa (%)	EP	Média (ng)	Frequência Relativa (%)	EP
1	455.10	10.97	242.11	206.05	20.32	67.35	1053.84	18.44	505.65
2	288.50	6.95	242.33	133.18	13.14	45.49	726.33	12.71	253.30
3	923.18	22.25	637.90	319.95	31.56	157.15	2347.23	41.07	768.78
4	1511.33	36.42	807.94	122.46	12.08	52.77	1358.93	23.78	298.63
5	68.11	1.64	36.26	4.54	0.45	4.54	22.25	0.39	12.85
6	903.77	21.78	429.91	227.72	22.46	211.88	206.92	3.62	79.11
Soma	4149.99	100.00		1013.90	100.00		5715.51	100.00	

EP = erro padrão

FONTE: O autor (2018).

TABELA 10 - Quantificação dos compostos presentes glândula odorífera abdominal de *Heliconius ethilla narcaea*

Nº	Macho Não Acasalado			Macho Acasalado			Fêmea acasalada		
	Média (ng)	Frequência Relativa (%)	EP	Média (ng)	Frequência Relativa (%)	EP	Média (ng)	Frequência Relativa (%)	EP
3	5764,30	30,13	1436,11	443,40	31,79	134,43	147,54	35,49	81,21
7	2294,09	11,99	826,15	187,81	13,46	71,84	33,19	7,98	23,11
9	2399,99	12,54	872,47	189,13	13,56	64,42	86,76	20,87	44,00
10	1021,23	5,34	490,23	118,50	8,50	70,41	23,08	5,55	7,26
11	3134,23	16,38	1099,04	177,58	12,73	44,06	35,53	8,55	21,07
12	1530,60	8,00	575,06	92,87	6,66	27,17	42,72	10,28	23,62
13	2399,37	12,54	645,01	160,68	11,52	87,95	30,58	7,36	21,40
16	588,06	3,07	271,50	24,93	1,79	10,79	16,36	3,93	9,34
Soma	19131,86	100,00		1394,91	100,00		415,77	100,00	

EP = erro padrão

FONTE: O autor (2018).

## APÊNDICE 2 – LICENÇAS EDITORIAIS

### SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Oct 23, 2018

This Agreement between Eliane O. Borges ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4454811186953
License date	Oct 23, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Arthropod-Plant Interactions
Licensed Content Title	Terpenoids dominate the bouquet of volatile organic compounds produced by <i>Passiflora edulis</i> in response to herbivory by <i>Heliconius erato phyllis</i> (Lepidoptera: Nymphalidae)
Licensed Content Author	Eliane de O. Borges, Camila B. C. Martins, Rodolfo R. da Silva et al
Licensed Content Date	Jan 1, 2017
Licensed Content Volume	12
Licensed Content Issue	1
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	full article/chapter
Will you be translating?	yes, without original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	501 to 1000
Author of this Springer Nature content	yes
Title	Terpenoids dominate the bouquet of volatile organic compounds produced by <i>Passiflora edulis</i> in response to herbivory by <i>Heliconius erato phyllis</i> (Lepidoptera: Nymphalidae)
Institution name	Universidade Federal do Paraná (UFPR)
Expected presentation date	Nov 2018
Order reference number	CAO2794
Specific Languages	Portuguese
Requestor Location	Eliane O. Borges SARMENTO LEITE AVE 500, 3RD FLOOR  PORTO ALEGRE, other 90050-170 Brazil Attn: Eliane O. Borges
Billing Type	Invoice
Billing Address	Eliane O. Borges SARMENTO LEITE AVE 500, 3RD FLOOR

