UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANTONIONI ACACIO CAMPOS MOLITERNO

INVESTIGAÇÃO COMPORTAMENTAL E MORFOLÓGICA DAS COLEOBROCAS *Eubulus* cf. *elongatus* HUSTACHE, 1924 E *Pappista notaticeps* (MARSHALL, 1925) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) E O ESTUDO DA EMISSÃO E BIOATIVIDADE DOS FEROMÔNIOS DOS PERCEVEJOS *Mormidea v-luteum* (LICHTENSTEIN, 1796) E *Arvelius albopunctatus* (DE GEER, 1773) (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)

CURITIBA

2021

ANTONIONI ACACIO CAMPOS MOLITERNO

INVESTIGAÇÃO COMPORTAMENTAL E MORFOLÓGICA DAS COLEOBROCAS *Eubulus* cf. *elongatus* HUSTACHE, 1924 E *Pappista notaticeps* (MARSHALL, 1925) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) E O ESTUDO DA EMISSÃO E BIOATIVIDADE DOS FEROMÔNIOS DOS PERCEVEJOS *Mormidea v-luteum* (LICHTENSTEIN, 1796) E *Arvelius albopunctatus* (DE GEER, 1773) (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Entomologia), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Entomologia).

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Gorgatti Zarbin

Coorientador(a): Profa. Dra. Maria Aparecida Cassilha Zawadneak

CURITIBA

2021

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

Moliterno, Antonioni Acacio Campos.
Investigação comportamental e morfológica das coleobrocas *Eubulus cf. elongatus* HUSTACHE, 1924 e *Pappista notaticeps* (MARSHALL, 1925) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) e o estudo da emissão e bioatividade dos feromônios dos percevejos *Mormidea v-luteum* (LICHTENSTEIN, 1796) e *Arvelius albopunctatus* (DE GEER, 1773) (HETEROPTERA: PENTATOMI DAE). / Antonioni Acacio Campos Moliterno. – Curitiba, 2021.
141 f. : il.

Orientador: Paulo Henrique Gorgatti Zarbin.
Coorientadora: Maria Aparecida Cassilha Zawadneak.

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

1. Animais – Comportamento sexual. 2. Dimorfismo sexual (Animais). 3. Morfologia (Animais). 4. Zoogeografia. 5. Broca (Inseto). 6. Feromonas. I. Título. II. Zarbin, Paulo Henrique Gorgatti. III. Zawadneak, Maria Aparecida Cassilha. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Entomologia).

CDD (20. ed.) 595.7

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 **ANTONIONI ACACIO CAMPOS MOLITERNO** intitulada: **INVESTIGAÇÃO COMPORTAMENTAL E MORFOLÓGICA DAS COLEOBROCAS *Eubulus* cf. *elongatus* HUSTACHE, 1924 E *Pappista notaticeps* (MARSHALL, 1925) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) E O ESTUDO DA EMISSÃO E BIOATIVIDADE DOS FEROMÔNIOS DOS PERCEVEJOS *Mormidea v-luteum* (LICHTENSTEIN, 1796) E *Arvelius albopunctatus* (DE GEER, 1773) (HETEROPTERA: PENTATOMI DAE)** , sob orientação do Prof. Dr. PAULO HENRIQUE GORGATTI ZARBIN, que após terem inquirido o aluno e realizada 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 Abril de 2021.

Assinatura Eletrônica
06/05/2021 07:04:24.0
PAULO HENRIQUE GORGATTI ZARBIN
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
07/05/2021 15:51:05.0
LUCIA MASSUTTI DE ALMEIDA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
07/05/2021 10:56:30.0
CHARLES MARTINS DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (EMBRAPA CERRADOS)

Assinatura Eletrônica
06/05/2021 10:24:10.0
JOSE MAURICIO SIMOES BENTO
Avaliador Externo (ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA - LUIZ DE QUEIROZ -USP)

Dedicatória:

Aos meus pais, dedico com grande carinho e amor, ao meu pai Antonio Jarbas Moliterno (*In Memoriam*) e a minha mãe Maria das Graças Campos Moliterno, bem como em especial aos meus queridos e estimados irmãos e irmã que sempre me apoiaram e incentivaram.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Entomologia pela oportunidade de realização do Doutorado.

Ao Prof. Dr. Paulo H. Gorgatti Zarbin e à Dr.ª Maria Aparecida Cassilha Zawadneak pelas orientações e amizade.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de Doutorado.

Ao Dr. Charles Martins de Oliveira da Embrapa Cerrados, Planaltina-DF, pelo suporte, auxílio, colaboração e amizade durante todo o desenvolvimento da tese.

À Prof. Dr.ª. Jocelia Grazia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelos seus ensinamentos e o enorme auxílio nas identificações dos percevejos.

À Prof. Dr.ª. Lúcia Massuti de Almeida pelos auxílios e ensinamentos.

Ao Dr. Professor Germano Henrique Rosa-neto, especialista em curculionídeos pelos auxílios e ensinamentos.

Ao Dr. Professor Maurício Osvaldo Moura valiosos auxílios e ensinamentos, principalmente na parte estatística.

Ao Dr. Carlos Eugênio Martins e Dr. Wadson Sebastião Duarte da Rocha da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Pelo enorme apoio, consideração, amizade e ensinamentos mesmo antes da realização do mestrado e agora finalizando o doutorado.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Semioquímicos da Universidade Federal do Paraná, ex-integrantes e atuais: Diogo Vidal, Daiane Szczerbowski, Camila Borges, Rodolfo da Silva, Sandra Mara, Rândilla R. Cordeiro, Maycon Roberto, Douglas Melo, Ignácio Ruiz, Samara Mendes, Leonardo Figueiredo, Luana, Maria Anze, Carla Maria, Eliane Borges e João Pedro.

Aos amigos da Pós-Graduação em Entomologia, professores, mestrandos e doutorandos, pelos grandes momentos e ensinamentos em aula e campo.

À doutoranda Adaiane Jacobina da Pós-Graduação em Entomologia da UFPR, por sua parceria e valiosa ajuda no estudo dos curculionídeos.

À minha amiga da Pós-Graduação em Entomologia desde a época do mestrado, Julia Flissak.

Aos amigos de longa data, Alan Alves Ripol, Ildernon Vinícius, José Severino Carneiro, Robério Oliveira e Jámison Castro (*In Memoriam*).

A minha família e parentes dos quais recebi incentivo e compreensão, mesmo distante e nos difíceis momentos eu senti extrema consideração, amor e fraternidade.

Para concluir, eu termino os meus agradecimentos sendo grato por muitas coisas, em especial pelas amizades, conhecimento e aprimoramento ao decorrer da minha jornada cientifica e pessoal. Assim agradeço por ter sido abençoado com muito conhecimento, amor, e muita fé e alegrias.

Epígrafes

Be water, my friend.

Se você coloca a água em um copo, água se torna o copo. Se você coloca a água em um bule, a água se torna um bule − Adapte-se as adversidades! − Bruce Lee.

Comigo é no pé-da-canjarana

Seja sem rodeos, seja firme – Antonio Jarbas Moliterno.

ORGANIZAÇÃO DA TESE

A presente tese está dividida em dois capítulos, e para cada capítulo seu próprio resumo. Para o primeiro capítulo foram estudadas coleobrocas da mandioca e pinhão-manso, *Eubulus* cf. *elongatus* Hustache, 1924 e *Pappista notaticeps* (Marshall, 1925) respectivamente. Este capítulo aborda os estudos morfológicos e comportamentais, e apontam-se importantes e hercúleas tarefas: (i) Separação e identificação de machos e fêmeas das espécies estudadas, (ii) Investigação do comportamento e período de atividade, e (iii) estudo da emissão de compostos candidatos a feromônios para ambas as espécies de coleobrocas.

No segundo capítulo, foram estudas duas espécies de percevejos de interesse agrícola, *Mormidea v-luteum* (Lichtenstein, 1796) e *Arvelius albopunctatus* (De Geer 1773). Para essas espécies foram os primeiros estudos sobre a ecologia química, em especial a identificação e evidenciação da bioatividade de compostos candidatos a feromônios envolvidos na comunicação intraespecífica. Por fim, os resultados obtidos com a espécie *Mormidea v-luteum* foram publicados em janeiro de 2021 no *Journal of Chemical Ecology*, volume 47 (capa). A seguir uma introdução geral breve dos temas abordados e os principais pontos que nortearam as pesquisas com essas espécies.

RESUMO

Os curculionídeos *Eubulus* cf. *elongatus* e *Pappista notaticeps* são endêmicos do neotrópico. A região ainda abriga uma fauna de insetos pouco conhecida, principalmente de espécie-pragas emergentes, a broca-da-mandioca *E.* cf. *elongatus* e a broca-do pinhão-manso *P. notaticeps.* Assim, os objetivos da pesquisa foram: (i) Investigar ocorrência de outra espécie de *Eubulus* sp. além de *Eubulus* cf*. elongatus* em mandioca (*Manihot esculenta*) via dados de morfologia externa, interna e com dados moleculares via DNA (COI); (ii) Identificar e caracterizar o dimorfismo interespecífico entre as espécies de coleobroca da mandioca, *E*. cf *elongatus* e *Eubulus* sp; (iii) Investigar o dimorfismo sexual de *Eubulus* cf. *elongatus* e *Pappista notaticeps*; (iv) Estudar o comportamento de ritmo circadiano e sexual de *Eubulus* cf. *elongatus*; (v) Determinar a razão sexual de *E.* cf. *elongatus* e *P. notaticeps*; (vi) Implementar a técnica de coleta de voláteis sexo-específica para *E.* cf. *elongatus* e *P. notaticeps*. Para averiguar a ocorrência de outra espécie de *Eubulus* sp. os insetos foram separados em dois morfotipos, *Eubulus* cf. *elongatus* e *Eubulus* sp. e analisados as suas morfologias externas e genitálias (N= 10) e para análise genética (N= 2) por morfotipo; Na investigação do dimorfismo sexual externo de *E*. cf. *elongatus* e *P*. *notaticeps* utilizou-se (N= 30) por espécie; enquanto para o comportamento de ritmo circadiano de *E*. cf. *elongatus* utilizou-se (N= 30) e sexual (N= 20); na razão sexual sondou-se amostras de 2017 de *E*. cf. *elongatus* (N= 171) e para 2018 (N= 341), e para *P*. *notaticeps* 2017 (N= 53) e 2018 (N= 87); por fim, a investigação da emissão feromonal foi realizada com (N= 10 machos) e (N= 10 fêmeas) via sistema de areação com câmaras de vidro mais dieta natural, mandioca. Os resultados obtidos pelos dados morfológicos e moleculares demonstraram a ocorrência de duas espécies *E.* cf. *elongatus* e *Eubulus* 'sp2'. A diferenciação entre as espécies é dada pela característica anatômica externa da região da tíbia posterior de adultos; Enquanto as fêmeas adultas de *E.* cf. *elongatus* se diferenciam dos machos pela presença de uma dilatação na tíbia posterior, da base para o ápice. Os machos adultos de *P. notaticeps* apresentam uma formação côncava na região do metaesterno, enquanto que nas fêmeas é convexa. Dados comportamentais de *E.* cf. *elongatus* evidenciaram uma atividade significativa na escotofase de 12 horas para ambos os sexos, o que no entanto não observou-se divergência entre os eventos de cópulas entre a fotofase versus a escotofase via Chi-quadrado 1.68 P= 0.25. O comportamento sexual da espécie ocorreu em três principais etapas, (i) pré-cópula, (ii) cópula e (iii) pós-cópula. Sendo (i) o encontro da fêmea e ascensão ao dorso; (ii) cortejo realizado pelo terceiro par de pernas ao tocar os uroesternitos da fêmea e em seguida a inserção do aedeagus; (iii) retirada do aedeagus e início do comportamento de guarda. A razão sexual de adultos de *E.* cf. *elongatus* quanto de *P. notaticeps* estiveram dentro da proporção esperada próxima de 1:1. As investigações das emissões feromonais sexo-específico para ambas as espécies não evidenciaram nenhum composto candidato a feromônio. O comportamento de *E*. cf. *elongatus* foi o primeiro para o gênero na região neotropical. Assim, os resultados obtidos pavimentam uma compreensão morfológica e comportamental da broca-da-mandioca e da broca-do-pinhão-manso de ocorrência brasileira. O presente estudo contribuiu para pesquisas futuras com o Manejo Integrado de Pragas e via Ecologia Química dessas espécies de coleobrocas.

Palavras-chave: Comportamento sexual. Dimorfismo. Morfologia. Neotropical. Semioquímicos.

ABSTRACT

Eubulus cf. *elongatus* and *Pappista notaticeps* belong to the Curculionidae family, and both are endemic of the neotropical region. The insect fauna of this region demands more comprehension, mainly about emerging species considered as a pest of commercial crops, such as the cassava-root-borer= *E.* cf. *elongatus* and *P. notaticeps*= stem-bore of *Jatropha curcas* L. Thus, the objectives of the thesis were: (i) to investigate the occurrence of another species of *Eubulus* sp. in addition to *Eubulus* cf. *elongatus* in cassava (*Manihot esculenta*) via data of external and internal morphology, and with molecular data via DNA (COI); (ii) to identify and characterize the interspecific dimorphism among the two species of cassava borer *E*. cf. *elongatus* and *Eubulus* sp. (iii) to investigate the sexual dimorphism between males and females of *Eubulus* cf. *elongatus* and *Pappista notaticeps*; (iv) to study the circadian rhythm and sexual behavior of *E.* cf. *elongatus*; (v) To determine the sex ratio of *E*. cf. *elongatus* and *P*. *notaticeps*; and (vi) To investigate the emission of sex-specific odours marked as sex-pheromone in *E*. cf. *elongatus* and *P. notaticeps* aeration technique was applied. The presence or absence of another species of *Eubulus* sp. in cassava cultivar BR399, the insects were separated by morphospecies, *Eubulus* sp. and *Eubulus* cf. *elongatus* (N= 10) and were analyzed their internal and external morphology, and the genetic analyses were conducted with both morphospecies (N= 2). The external sexual dimorphism was conducted to *E*. cf. *elongatus* and *P*. *notaticeps* (N= 30) per species, while the sexual behavior (N= 20) and circadian rhythm (N= 30) was only performed to *E*. cf. *elongatus. T*he sexual rate was performed for both species during 2017 and 2018. Within 2017 to *E*. cf. *elongatus* (N= 171) and in 2018 (N= 341), to *P*. *notaticeps* in 2017 (N= 53) and in 2018 (N= 87). The investigation of pheromonal emission was performed with samples (N= 10 males) and (N= 10 female) via aeration system, in which each sample was separated by sex and species in a glass chamber and feed-based natural diet, cassava. With this, the results via morphological and molecular data showed that *E*. cf. *elongatus* and *Eubulus* 'sp2' are different species, which may be differentiated via external anatomical features located in the hind tibia; The sexual dimorphism in *E.* cf. *elongatus* showed that females in opposite to the males an expansion of the hind tibia, from the base to the apex. In *Pappista notaticeps*, dimorphism was located in the metasternum region, in which a concave formation was observed for males and convex for females. The behavioral data of *E.*cf. *elongatus* showed a nocturnal activity during the 12 hours of the scotophase for both sexes, although did not statistical difference between mating events photophase versus scotophase Chi-square 1.68 P= 0.25. The sexual behavior of *E. cf. elongatus* may be understood in three main stages: (i) pre-copulation, (ii) copulation, and (iii) post-copulation. It is followed by (i) male finds the female and climb on her back; (ii) starting the courtship behavior, and the hind leg of male touching the female uroesternites and subsequently, the aedeagus is inserted; (iii) male removes the aedeagus and starting the period of mating guarding on the back of the female. Results of the sex ratio investigated of *E.* cf. *elongatus* and *P. notaticeps* revealed a proportion of 1:1. To investigate an emission of sex-specific odours as pheromones, and the analyses of male and female extracts did not show any sex-specific candidate compound as pheromones for both species studied. The sexual behavior of *E. cf. elongatus* was marked as the first work within of the gender to the Neotropical region. In general, the results are strong useful for a better

morphological and behavioral understanding of the cassava-root-borer and the stem-bore of *Jatropha curcas*, which also may help and pave the Integrated Pest Management as well as in future studies regarding with Chemical ecology of these species.

Keywords: Morphology. Neotropical. Sexual Behaviour. Sexual Dimorphism. Semiochemicals.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Investigação sobre a morfologia, dimorfismo, comportamento, razão sexual e a emissão feromonal das coleobrocas *Eubulus* cf. *elongatus* Hustache, 1924 e *Pappista notaticeps* (Marshall, 1925) **(Coleoptera: Curculionidae)** **16**

1. INTRODUÇÃO **16**

2. REVISÃO DA LITERATURA 18

2.1 O CULTIVO DA MANDIOCA E PINHÃO-MANSO 18

2.2 CURCULIONIDAE LATREILLE, 1802: DIVERSIDADE DE ESPÉCIES E SUA IMPORTÂNCIA AGRÍCOLA 20

2.3 CURCULIONIDAE: Biologia, Comportamento e Comunicação 23

2.3.1 Biologia 23

2.3.2 Comportamento e comunicação 24

2.4 FEROMÔNIOS DE INSETOS: CURCULIONIDAE 25

2.4.1 Feromônios de insetos e sua potencialidade: Curculionidae 25

3. OBJETIVOS **28**

3.1 OBJETIVO GERAL 28

3.1.1 Objetivos específicos 28

4.MATERIAL E MÉTODOS **29**

4.1. OBTENÇÃO DOS INSETOS E SUA MANUTEMÇÃO 29

4.2 ESTUDOS MORFOLÓGICOS DAS COLEOBROCAS *Eubulus cf. elongatus, Eubulus* sp. e *Pappista notaticeps* 30

4.2.1 Avaliação do dimorfismo interespecífico das brocas-da-mandioca: *Eubulus* cf. *elongatus* e *Eubulus* (sp2) 30

4.2.2 Dimorfismo sexual da broca-da-mandioca, *Eubulus* cf. *elongatus* 30

4.2.3 Dimorfismo sexual da broca-do-pinhão-manso: *Pappista notaticeps* 31

4.2.4 Avaliação da razão sexual da coleobroca *Eubulus* cf. *elogantus e Pappista notacipes* 31

4.3 ESTUDO COMPORTAMENTAL DE *Eubulus* cf. *elongatus* 32

4.3.1 Investigação do ritmo circadiano de *Eubulus* cf. *elongatus* 32

4.3.2 Investigação do comportamento sexual de *Eubulus* cf. *elongatus* 32

4.4 TÉCNICA DE COLETA DE VOLÁTEIS 33

4.4.1 Coleta e obtenção dos extratos de macho e fêmeas das coleobrocas.....33
4.4.2 Análise dos extratos de machos e fêmeas das coleobrocas.....34
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....35
5.RESULTADOS.....36
5.1 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA INTERESPECÍFICA DAS BROCAS-DA-MANDIOCA *Eubulus* cf. *elongatus* 'sp1' e *Eubulus* 'sp2'.....36
5.2 INVESTIGAÇÃO DO DIMORFISMO SEXUAL DAS COLEOBROCAS**:** *Eubulus* cf. *elongatus* e *Pappista notaticeps*.....38
5.3 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DA COLEOBROCA-DA-MANDIOCA**:** *Eubulus* cf. *elongatus*.....40
5.4 RAZÃO SEXUAL DA COLEOBROCA DA MANDIOCA *Eubulus* cf. *elongatus* e *Pappista notaticeps*.....43
5.5 COLETAS DE VOLÁTEIS DAS ESPÉCIES *Eubulus* cf. *elongatus* e *P. notaticeps*.....44
6.DISCUSSÃO.....46
7.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....50
7.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....50
8. REFERÊNCIAS.....52

CAPÍTULO 2: Identificação dos compostos candidatos a feromônios de *Mormidea v-luteum* **(Lichtenstein, 1796) e a investigação da bioatividade e dinâmica de produção de compostos sexo-específicos de** *Arvelius albopunctatus* **(De Geer 1773) e a (Heteroptera: Pentatomidae).....72**
RESUMO.....72
ABSTRACT.....74
1. INTRODUÇÃO.....76
2. REVISÃO DA LITERATURA.....78
2.1 O CULTIVO DE ARROZ E TOMATE E AS SUAS PRINCIPAIS ESPÉCIES PRAGAS DE PERCEVEJOS PENTATOMÍDEOS.....78
2.2 HETEROPTERA: PENTATOMIDAE.....80
2.3 BIOLOGIA, COMPORTAMENTO E COMUNICAÇÃO EM PETANTOMIDAE.....81
2.3.1 Biologia.....81
2.3.2 Comportamento e comunicação 82

2.4 Feromônios de insetos: Pentatomidae.....83
2.4.1 Feromônios de insetos: Pentatomidae (Pentatominae).....83
2.4.2 Potencialidades do uso de ferômonios na agricultura.....92
3. OBJETIVOS.....94
3.1 OBJETIVO GERAL.....94
3.1.1 Objetivos específicos.....94
4. MATERIAL E MÉTODOS.....95
4.1 OBTENÇÃO DOS INSETOS.....95
4.2 TÉCNICA DE COLETA DE VOLÁTEIS.....96
4.2.1 Coleta de voláteis de machos e fêmeas de *Mormidea v-luteum*.....96
4.2.2 Coleta de voláteis de machos e fêmeas de *Arvelius albopunctatus* 97
4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS SEXO-ESPECÍFICOS DE *Mormidea v-luteum* e *Arvelius albopunctatus*.....98
4.3.1 Padrões sintéticos utilizados na identificação dos compostos macho-específico de *Mormidea v-luteum*.....99
4.4 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS EMITIDOS POR *Mormidea v-luteum* E *Arvelius albopunctatus*.....99
4.4.1 Dinâmica de produção dos compostos candidatos a feromônio de *Arvelius albopunctatus*.....99
4.5 TESTES DE BIOATIVIDADE COM OS COMPOSTOS SEXO-ESPECÍFICOS CANDIDATOS A FEROMÔNIO DE *Mormidea v-luteum* e *Arvelius albopunctatus*.100
4.5.1 Bioensaio em olfatometria de *Mormidea v-luteum*.....100
4.5.2 Bioensaio em olfatometria em “Y” de *Arvelius albopunctatus*.....101
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....102
5. RESULTADOS.....103
5.1 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS MACHO-ESPECÍFICO DE *Mormidea v-luteum*.....103
5.1.1 Caraterização dos grupos funcionais dos compostos majoritários candidatos a feromônio de *Mormidea v-luteum*.....105
5.1.2 Co-injeção e confirmação compostos candidato a feromônio de *Mormidea v-luteum* (1-6).....106
5.1.3 Bioensaios em Olfatometria em ‘Y’ com os compostos naturais e sintéticos de *Mormidea v-luteum*.....108

5.1.4 Identificação e quantificação dos compostos macho-específicos de *Arvelius albopunctatus*.....110
5.1.5 Dinâmica de produção dos compostos macho-específicos de *Arvelius albopunctatus*.....112
5.1.6 Bioensaios em olfatometria em 'Y' de *Arvelius albopunctatus*.....115
6. DISCUSSÃO.....117
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....120
7.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....120
8. REFERÊNCIAS.....122

CAPÍTULO 1: Investigação sobre a morfologia, dimorfismo, comportamento, razão sexual e a emissão feromonal das coleobrocas *Eubulus* cf. *elongatus* Hustache, 1924 e *Pappista notaticeps* (Marshall, 1925) **(Coleoptera: Curculionidae)**

1. INTRODUÇÃO

A mandioca, *Manihot esculenta* (Crantz) e o pinhão-manso, *Jatropha curcas* L. pertencem à família Euphorbiaceae e são plantas nativas da região Neotropical (FUKUDA et al., 1996; HELLER, 1996; BRESSAN, 2011). Ambas as culturas podem ser consideradas cosmopolitas (GEXSI, 2008; SOUZA et al., 2009; DIVAKARA, 2010; KAMEL, 2018). Entre estes cultivos, a cultura da mandioca é que mais se destaca, principalmente pelos estados brasileiros, sendo estados do Pará, Paraná e Bahia os maiores produtores (IBGE, 2020). Em outros países, as maiores produções do cultivo da mandioca ocorrem na Tailândia, Indonésia, Gana, Índia e na Nigéria, assim seja na produção nacional e/ou internacional este cultivo é fundamental para países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (FAO, 2018).

Ademais, os fatores que afetam estas culturas, sejam no desenvolvimento e/ou produtividade são as espécies ditas como artrópodes-praga, tais como ácaros, cochonilhas, curculionídeos e melolontídeos (BELLOTTI; VAN, 1978. DE OLIVEIRA et al., 2007; PINTO-ZEVALLOS et al., 2016). Estima-se para espécies de insetos-pragas uma perda econômica de até 17,7 bilhões de dólares por ano (GALLO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2014). Os danos gerados podem variar de acordo com o hábito alimentar de cada espécie (MONTE, 1940; GALLO et al., 2002). Em cultivos de mandioca e pinhão-manso, são os quais têm sido afetados por larvas e adultos de curculionídeos que ocasionam o broqueamento dos caules e raízes (RODRIGUEZ, et al., 2009; GARCIA; DOS SANTOS, 2013; DE OLIVEIRA et al., 2019).

As espécies de curculionídeos consideradas pragas que atacam os cultivos de mandioca e pinha-manso no Brasil são *Eubulus* cf. *elongatus* Hustache, 1924 e *Pappista notaticeps* (Marshall, 1925) respectivamente (OLIVEIRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019). No estado da Bahia, há registros de espécies de *Pappista* spp. que foram identificados como *Sternocoelus* spp. em cultivos de mandioca, e *Cophes notaticeps* foi reportado como espécie-praga do pinhão-manso em Planaltina, Distrito-Federal (GARCIA; DOS SANTOS, 2013; OLIVEIRA et al., 2017).

Atualmente, os gêneros *Sternocoelus* Kuschel, 1955 e *Cophes* Champion, 1905 (Coleoptera: Curculionidae) compõe um único gênero, *Pappista* sensu Alonso-Zarazaga e Lyal (1999). As fêmeas dessas espécies de coleobrocas podem perfurar as hastes das suas respectivas plantas hospedeiras (mandioca e o pinhão-manso) para oviposição de ovos e, ao eclodirem, as larvas broqueiam o caule e/ou as raízes para alimentação e assim ocasionam a perda de vigor, produtividade e consequentemente a morte da planta hospedeira (MONTE, 1940; FREIRE et al., 2010; DE OLIVEIRA, 2011). Em alta infestação podem ocasionar danos econômicos, por afetarem a produção em qualidade e quantidade.

Diante a infestações medidas de controle tornam-se necessárias, sendo para o controle de espécies insetos-praga, o uso de agrotóxicos o mais difundido (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012; PERES, 2009; MIGUEL et al., 2018; BOTELHO et al., 2020). Nos últimos 20 anos houve um acréscimo próximo de 19 mil toneladas/ano de ingredientes ativos comercializados, quais somente em 2018 foram mais de 500 mil toneladas (IBAMA, 2019). O aumento na comercialização está associado a fatores como espécies-pragas não suscetíveis às moléculas de agrotóxicos e também ao aumento no número de espécies que causam injurias as culturas, e também o uso irracional pode ser um fator impactante para o aumento da comercialização (GALLO et al., 2002; DOS ESTADOS, 2018; WHO & FAO, 2020). Contudo, há espécies em que o uso de agrotóxicos torna-se ineficaz, como é o caso das coleobrocas, que devido o habito endofítico e/ou subterrâneo inviabiliza o seu uso como é o caso das espécies *E. elongatus* e *P. notaticeps*.

Assim, atualmente, a necessidade de controle de espécies de insetos-praga tem levado a busca por técnicas eficientes, ecológicas e práticas, e que ainda possam substituir ou reduzir o uso dos agrotóxicos (ZARBIN, 2009; PIMENTEL; PESHIN, 2014). Dentre os destaques de estudo está à Ecologia Química e o estudo dos Semioquímicos, significado que deriva do grego “*semêion*” sinal, ou seja, os “sinais químicos”, os quais são utilizados na comunicação de inúmeros seres vivos (BERGSTROM, 2007). De modo geral, os semioquímicos compreendem os sinais interespecíficos (Aleloquímicos) e intraespecíficos (Feromônios). A comunicação química mediada pelos feromônios é gerada a partir de compostos secretados pelo seu coespecifico, macho ou fêmea de uma espécie de inseto; assim, o estímulo comportamental da resposta da “mensagem química” recebida pode ser traduzido

como um sinal químico de agregação, alarme, sexual, dentre outros (ZARBIN et al., 2009; JOACHIM et al., 2013; PINTO-ZEVALLOS; ZARBIN, 2013).

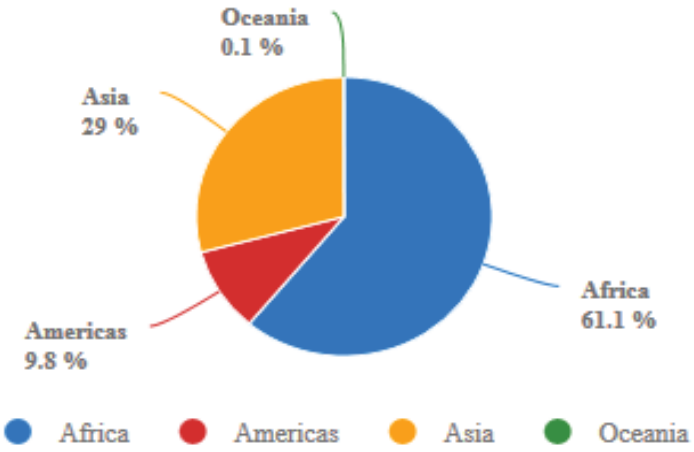
Atrelado ao estudo da comunicação química de espécies de insetos-praga aponta-se o estudo do comportamento e hábito de vida. As coleobrocas dispendem grande parte de sua vida no interior da planta hospedeira, um fato que influência diretamente em seu controle (MONTE, 1940; FARIAS, 1991; RODRIGUEZ, et al., 2009). Outros pontos importantes são a identificação da espécie alvo e da diferenciação de machos e fêmeas. Os estudos de flutuação populacional, biologia e emissão de semioquímicos são a base do estudo de uma espécie praga, uma vez que um dos sexos pode ser o responsável pelo chamamento via voláteis sexo-atrativos, como os feromônios sexuais e de agregação (ZARBIN et al., 1999; SILVA-FILHO et al., 2007; ZARBIN, 2009; VANIN; BENÁ, 2015). Diante dos pontos levantados, a fauna neotropical das espécies de *Eubulus* sp. ainda são pouco conhecidas; os últimos estudos taxonômicos foram desempenhados pelo entomólogo alemão Carl Fiedler (FIEDLER, 1939; 1952; 1954a; 1954b). Ademais, os trabalhos sobre a biologia, comportamento e hábito de vida detalhados das espécies de coleobrocas *E. elongatus* e *P. notaticeps* ainda são escassos na literatura.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O CULTIVO DA MANDIOCA E PINHÃO-MANSO

O cultivo da mandioca na região neotropical tem registro há mais de mil anos (CREPALDI, 1992). Atualmente o cultivo é mundial, e sua maior representatividade de produção concentra-se no continente Africano com 61,1% (Figura 1) (FAO, 2018). Com uma multifuncionalidade, pode-se obter das raízes inúmeros produtos e subprodutos como, farinha, tapioca e inclusive biopolímeros para desenvolvimento de bioplásticos (CREPALDI, 1992; LAROTONDA et al., 2002; DA ROCHA et al., 2020). Além disso, as gemas das hastes são empregadas em uma nova cultura, e as folhas e raízes têm apresentado potencialidades para utilização na alimentação animal (FUKUDA et al., 1996; PESTANA; CASTRO, 2015). O Brasil é o maior produtor das Américas e figura em quinto lugar na produção de mundial, com uma produção de 17,6 milhões de toneladas em 2018 e 19 milhões de toneladas em

2019; contudo, o maior produtor com cerca de 50 milhões de toneladas é a Nigéria (FAO, 2018; IBGE, 2020).



Fonte: FAO, 2018

FIGURA 1 - Representação da Produção de Mandioca por continentes

Com esse parâmetro de produção, funcionalidade e regiões de dependentes desta cultura, uma cultura de subsistência (FAO, 2014), reforça-nos a importância de se trazer medidas de controle racionais e com respaldo científico no controle de espécies-pragas que ameaçam a produção e qualidade dos cultivos de mandioca (BELLOTI et al., 1994; NASSAR; ORTIZ, 2007). Além de uma cultura polivalente e de grande importância econômica para o Brasil, o Programa de Melhoramento Genético de Mandioca tem sido um passo essencial para aumento da produtividade (FUKUDA, 1995; FUKUDA et al., 1996), e entre os cultivares de destaque está o cultivar de mesa BRS 399 com produtividade de até 57,3 toneladas/hectares (EMBRAPA, 2015). Além disso, planos de manejo de espécies de pragas do cultivo tem sido necessários (LOZANO, 1981; GALLO, 2002; NASSAR; ORTIZ, 2007).

Para cultivo de pinhão-manso (*J. curcas*), o qual apresenta versatilidade para elaboração de subprodutos como obtenção de biodiesel e materiais para constituição de ração animal (MONTES; MELCHINGER 2016). O pinhão-manso é uma arvore de porte pequeno a médio e que pode variar de três até 10 metros de altura; com a inflorescência unissexual, após polinização marca-se o início do estágio reprodutivo com a formação dos frutos com por volta de 10 frutos verdes e com 2 a 3 de diâmetro por ramo (CARELS, 2009). A matéria prima para o biodiesel ocorre através das sementes oleaginosas com teores de concentração média de até

38,1%, (HELLER, 1996; GEXSI, 2008; SOUZA et al., 2009; DIVAKARA, 2010; KAMEL, 2018). A propagação da cultura pode ser realizada de dois modos, por estaquias ou pelas sementes (CARELS, 2009; SHARMA et al., 2012).

A produtividade do cultivo pode variar de acordo com as condições edafoclimáticas e variar entre duas a quatro toneladas/hectare, e contabilizar até 1,5 toneladas de óleo por hectare colhido de sementes ano (CARELS, 2009). Além da potencialidade de biodiesel, pesquisas voltadas para atividade biológica dos compostos oriundos do óleo essencial das sementes, apontaram para uma atividade inseticida e também farmacológica obtida da espécie *J. curcas* (ADEBOWALE; ADEDIRE, 2006; SHARMA et al., 2012).

No cultivo do pinhão-manso, os fatores que podem afetar a produtividade estão o ataque de coleobrocas, que durante o ciclo larval desenvolvem-se no seu interior, como é o caso da espécie *Pappista notaticeps* (= *Coelosternus notaticeps* e *Sternocoelus notaticeps)* (LEATHERDALE, 1977; OLIVEIRA, 2011).

2.2 CURCULIONIDAE LATREILLE, 1802: DIVERSIDADE DE ESPÉCIES E SUA IMPORTÂNCIA AGRÍCOLA

Inseridos na classe Insecta, os insetos abrigam uma fauna entre 925 mil a 1 milhão de espécies descritas para o mundo (GRIMALDI; ENGEL, 2005; STORK, 2017; ROSKOV et al., 2020) e representam cerca de 60% de toda biodiversidade conhecida no planeta (GRIMALDI; ENGEL, 2005; CARVALHO, 2012). O Brasil concentra uma biota megadiversa de espécies de insetos, algo por volta de 9,5% do total mundial, e em números cerca de 110 mil espécies descritas (LEWINSOHN; PRADO, 2005; AGUIAR et al., 2009).

Somente para Ordem Coleoptera foram descritas 323 mil espécies e com grande representatividade para família Curculionidae Latreille, 1802 (ROSKOV et al., 2020). Anderson (2002) apontava uma fauna de cerca de 60 mil espécies, e atualmente, o número de espécies conhecidas vivas está por volta de 82 mil (ROSKOV et al., 2020). De um modo geral, os curculionídeos possuem hábito de vida diversificado. Na sua maioria são fitófagos e alimentam-se da parte aérea, externa ou interna da planta hospedeira, enquanto outras espécies são encontradas se alimentando de raízes, de frutos ou sementes das plantas hospedeiras, por

exemplo, plantas ruderais (plantas pioneiras) e/ou de valor econômico (LYAL, 1996; ANDERSON, 2002; DE OLIVEIRA, 2011; DE OLIVEIRA 2009).

Os curculionídeos variam de 0,5 a 90 mm de comprimento, sendo o corpo altamente esclerosado e compacto (CASSARI; IDE, 2012). Os adultos geralmente possuem um rostro prolongado, enquanto as antenas são do tipo genículo-clavadas e com sua inserção variando entre a região próxima da base ao ápice do rostro (MARVALDI, A; LANTERI, 2005). Em algumas espécies a inserção das antenas pode ser um caráter de dimorfismo sexual (intraespecífico) (BARRETO; ROSADO-NETO, 2012). Dentro das subfamílias do grupo, Molytinae Schoenherr, 1823 abriga vastas espécies de interesse econômico, cita-se *P. notaticeps* e *E.* cf*. elongatus* ambas coleobrocas de importância agrícola para as culturas do pinhão-manso e mandioca (OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2019). Ressalta-se que anteriormente Cryptorhynchinae Schoenherr, 1825 era considerada como subfamília válida, contudo sua posição tem sido questionada ao longo dos anos, e assim considerou-se a utilização para a presente tese o *sensu* Lyal 2014 (OBERPRIELER et al., 2007; OBERPRIELER, 2014; LYAL, 2014). Assim, a antiga subfamília Cryptorhynchinae atualmente tribo Cryptorhynchini apresenta para a região Neotropical mais de 220 gêneros que carecem de muitos estudos (ANDERSON 2002, OBERPRIELER et al., 2014). Uma vez que somente na América do Sul, a fauna de Molytinae está dividida em 19 tribos com 749 gêneros, além de uma tribo introduzida com cinco gêneros (LYAL, 2014); acrescenta-se também que somente o gênero *Eubulus* sp. abriga mais de 80 espécies de ocorrência no Brasil (WIBMER; O'BRIEN, 1986).

De um modo geral, os curculionídeos da subfamília Molytinae possuem à presença de um canal na região do pro e meso-esterno, geralmente em formato de cálice que aloja o rostro, o receptáculo ou sulco esternal (MARVALDI, A; LANTERI, 2005). Ainda dentro de Molytinae a região external e abdominal podem evidenciar caracteres de dimorfismo sexual (SILVA-FILHO et al., 2007; BARRETO; ROSADO-NETO, 2012). Assim, diante da expressiva diversidade da diversidade do grupo, os dados morfológicos, internos e externos, investigações sobre semioquímicos, informações genéticas de genes conservados e de baixa mutação têm sido utilizados para subsidiar a identificação de espécies animais e em filogenias, como por exemplo, as subunidades mitocondriais dos ribossomos dos nucleotídeos 18S rRNA, 16S rRNA e do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase 1 (CO1) (HEBERT et

al., 2003; AMBROGI et al., 2009; RAMADAN; BAESHEN, 2012). Ademais, o CO1 tem ganhado destaque pelo seu poder de resolução, ao passo que possui uma região solidamente bem conservada e pela rápida resposta em análises de complexo de espécies (HEBERT et al., 2003; JINBO; KATO; 2011; MADDEN et al., 2019). Além da determinação de uma espécie, o conhecimento a respeito do hábito de vida é muito importante bem como a sexagem, pois são passos chaves para os estudos sobre emissão feromonal, no qual geralmente um dos sexos é o emissor da mensagem química, por exemplo, sinais como agregação ou sexual (ZARBIM ET AL., 1999; ZARBIM et al., 2009).

No contexto de espécies de insetos-praga da família Curculionidae, certas espécies de coleobrocas têm sido reportadas nos mais diferentes cultivos tais como algodão, soja, mamão, coco, banana, acerola, laranja, cacau, abacate, e mais recentemente as coleobrocas *Eubulus* cf. *elongatus* a brocas-da-mandioca e *Pappista notaticeps* a broca-do-pinhão-manso, que se desenvolvem no interior da planta hospedeira causam até irreversíveis danos (Marshall, 1925) (MONTE, 1940; GALLO, 2002; DE OLIVEIRA et al., 2011; DE OLIVEIRA et al., 2019). Dados aprofundados sobre *P. notaticeps* ainda são escassos, como é o caso do dimorfismo sexual de sua Ecologia Química (Ex. estudos sobre emissão feromonal). Entretanto, dados da distribuição espacial revelaram picos populacionais altos de *P. notaticeps* entre novembro e dezembro (OLIVEIRA et al., 2017).

No Brasil, ainda há registro de outras três espécies de *Eubulus* alimentando-se em diferentes plantas hospedeiras, *Eubulus* sp., *Eubulus triangularis* (Boheman, 1837) em *Vernonia* sp. (Asteraceae), *Eubulus virgatulus* Marshall 1933 em caule de Acantácea, e *Zascelis multicostatus* (= *Eubulus theobromae* sensu WIBMER; O'BRIEN, 1986) em *Theobroma cacao* (Cacau) (COSTA-LIMA, 1956). Para Silva (2014) foi evidenciado um representante de *Eubulus* sp. alimentando-se de *Alibertia edulis* (Rubiaceae). Assim, observa-se a carência de estudos de morfologia, biologia e comportamento dos espécimes neotropicais representantes de *Eubulus* e *Pappista*, visto ainda a escala temporal dos dados obtidos, e inclusive devido ao surgimento de espécies de interesse econômico no cultivo de mandioca e pinhão-manso no Brasil.

2.3 CURCULIONIDAE: Biologia, Comportamento e Comunicação

2.3.1 Biologia

Larvas e adultos de curculionídeos possuem o hábito alimentar fitófago e endofítico, ou seja, com o desenvolvimento e alimentação ocorrendo no interior da planta hospedeira (ANDERSON, 2002; OBERPRIELER et al., 2007; LYAL, 2014). A subfamília Molytinae de ocorrência cosmopolita e hábitos alimentares diversificados, podem se alimentar de diferentes estágios da planta hospedeira, como frutos, caule ou raízes (O'BRIEN; COUTURIER 1995; HOFFMANN-CAMPO et al., 1999; VANIN; GAIGER, 2005; LYAL, 2014; DE OLIVEIRA et al., 2019). Somente para a região Neotropical inúmeras espécies de importância econômica têm sido reportadas para diferentes tipos de culturas, como goiaba, cacau, cupuaçu, pau-rosa e soja, mandioca e pinhão-manso (ver. MENDES et al., 1997; HOFFMANN-CAMPO et al., 1999; THOMAZINI, 2000; BAILEZ et al., 2003; NUNES et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2011; DE OLIVEIRA et al., 2019).

Durante seus desenvolvimentos no interior da planta hospedeira, os broqueamentos produzidos, ou seja, a formação de galerias no interior da planta hospedeira ocasiona uma seria lesão interna, o que compromete o transporte de nutrientes e pode levar a morte da planta (GALLO et al., 2002; OLIVEIRA, 2011). Para diferentes espécies de curculionídeos, as larvas podem atacar diferentes áreas das plantas, como caule, galhos, frutos e raízes (FERREIRA et al., 1997; GIBLIN-DAVIS, 2001; OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2019). O tempo de desenvolvimento dessas espécies também tem sido variado, do estágio de ovo ao adulto entre 60 a 185 dias e longevidade dos adultos superior a 100 dias (GIBSON, 1964; SILVA, 1999; BAILEZ et al., 2003; SARRO et al., 2004), além disso, o dano ocasionado pode ser de 50 a 100% da produção, como tem sido reportado para a broca-da-mandioca *Eubulus* cf. *elongatus* (GASSEN, 1987; SILVA; 1999; OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2019).

A biologia de *E.* cf. *elongatus* pouco ainda se sabe, no qual os ovos de cor branca e de formato oblongo com aproximadamente 0,8 milímetros de comprimento são ovipositados no interior da caule da mandioca; para larvas sua coloração tem variado do branco a cor creme e um comprimento de 13 milímetros, sendo neste estágio o qual geral maior dano e inúmeras galerias do caule até a raiz; após passar

pelo instares larvais, ocorre a formação da pupa na raiz, e então por último a emergência dos adultos (OLIVEIRA et al., 2019).

2.3.2 Comportamento e comunicação

Informações de comportamento e comunicação de espécies de insetos-praga são importantes para subsidiar o seu manejo, pois a comunicação visual, sonora e/ou odorífera entre indivíduos de uma mesma espécie pode gerar um comportamento específico, seja para atrair ou repelir os indivíduos em armadilhas colocadas em uma área de cultivo (ROSADO-NETO; SANTOS, 2010; MANKIN, 2011; REDDY et al., 2011; MARTINS, 2013). Em campo, a detecção de uma molécula de odor sexo-especifica é realizada pelo par de antenas, as quais possuem cerdas, as sensilas, responsáveis pela recepção das moléculas de odores que posteriormente são traduzidas, por exemplo, em um sinal químico de agregação e/ou sexual (LEAL, 2005; ZARBIN et al., 2009).

Os principais dados de comportamento de espécies de curculionídeo pragas agrícolas são o comportamento cópula, a comunicação visual e a comunicação mediada por voláteis, a exemplo de feromônios (AMBROGI; ZARBIN, 2008; AMBROGI et al., 2012; UZAKAH; ODEBIYI 2015). Sobre o comportamento de cópula, o acasalamento observado em laboratório de *Conotrachelus naso*, *Conotrachelus posticatus* e *Conotrachelus carinifer* iniciaram-se por volta do quarto dia após a emergência dos adultos (GIBSON, 1964), enquanto para *C. psidii o* comportamento de cópula foi observado cerca de 14 dias após a emergência da câmara pupal (BAILEZ et al., 2003). A análise do comportamento sexual em laboratório permite entender o estágio de reprodução e estimar o período de reprodução a campo, um fator importante para entender o estágio de reprodução, os picos populacionais e a comunicação a nível intraespecífico de espécies de interesse econômico (GIBSON, 1964; MARTINS, 2013; UZAKAH; ODEBIYI 2015). Outro componente a ser investigado, o comportamento de alimentação, pode ainda informar o momento do inicio do monitoramento de insetos-praga, assim como reportado para *C. humeropictus* que larvas e adultos que atacam frutos de cupuaçu em diferentes estágios de desenvolvimento (THOMAZINI, 2000).

A importância da investigação do comportamento de comunicação visual e odorífero de espécies-praga exemplifica-se, para *Rhabdoscelus obscurus*

(Boisduval, 1835) (Coleoptera: Dryophthoridae) e *C. sordidus,* que diferentes características das armadilhas iscadas com o feromônio da espécie e avaliadas em razão da cor, tamanho e tipo de armadilha adotada podem influenciar na taxa de captura de adultos (REDDY et al., 2011; REDDY; RAMAN, 2011). Por fim, entre os curculionídeos, há espécies em que ambos os sexos foram documentados emitindo sons audíveis através do aparelho estridulatório do tipo élitro-tergal (ROSADO-NETO; SANTOS, 2010). Interessantemente, os sons produzidos e analisados de três espécies, *Conotrachelus naso*, *C. carinifer* e *C. posticatus* evidenciaram uma diferença à nível intra e interespecífico entre eles (GIBSON, 1967).

2.4 FEROMÔNIOS DE INSETOS: CURCULIONIDAE

2.4.1 Feromônios de insetos e sua potencialidade: Curculionidae

Os feromônios são substâncias espécie-específicas secretadas por uma espécie, que recebida pelo seu coespecífico, macho ou fêmea, mediará uma reposta comportamental (KARLSON; LÜSCHER, 1959). A partir disso, o uso de feromônio na agricultura tem-se tornado uma valiosa ferramenta que possibilita entender, por exemplo, como as espécies de insetos se comunicam em um nível intraespecífico e assim possibilita utilizarmos essa comunicação no seu controle, de forma espécies especifica (VILELA; DELLA LUCIA, 1987; REDDY et al., 2011).

Desde a identificação em 1959 da primeira molécula de feromônio sexual da mariposa *Bombix mori* (L. 1758) (Lepidoptera: Bombycidae), a área de estudo com feromônios tem crescido (BUTENANDT, et al., 1959; MOREIRA et al., 2005; El-SAYED, 2020). Nas últimas duas décadas, várias espécies de insetos-praga, incluindo os curculionídeos, tiveram estudos voltados para identificação feromonal (ZARBIN et al., 2009; AMBROGI et al., 2009; BERGMANN et al., 2009; AMBROGI et al., 2012; SZCZERBOWSKI et al., 2016; VIDAL, et al. 2019). Desse modo, abre-se um mercado para viabilização e implementação das moléculas identificadas, as quais têm um enorme potencial de serem adotadas no controle e/ou monitoramento das espécies de importância econômica no Brasil e no mundo.

Com o uso dos feromônios em cultivos agroflorestais, há possibilidades de realizar medidas como o monitoramento, coleta massal ou confusão sexual; No monitoramento detecta-se a presença ou ausência da espécie de inseto-praga no

campo, enquanto a coleta massal age na redução do nível da população de uma dada espécie-praga especifica; Na confusão sexual, ocorre a saturação do ambiente com o(s) composto(s) sexual (is) que atuam na diminuição da taxa de cópula, e posteriormente reduz o nível populacional (VILELA; DELLA LUCIA, 1987; VILELA; DELLA LUCIA, 2001; ZARBIN et al., 2009). Ressalta-se que as coleobrocas possuem comumente o hábito endofítico e o uso de inseticidas são ineficazes, o que reforça a busca por alternativas viáveis e ecológicas na luta contra espécies-pragas de insetos (GALLO et al., 2002; AMBROGI et al., 2009).

Ao agirem de modo espécie-especifico, os feromônios não afetam as espécies de insetos benéficos à agricultura, contribuem na redução do uso de inseticidas e em seus efeitos adversos, tais como, a resistência dos insetos alvo às moléculas de inseticidas, presença de resíduos em alimentos e bem como na redução da contaminação ambiental (VILELA, 1997; ZARBIN et al., 2009; PIMENTEL; BURGESS, 2014; BENTO et al., 2016; HAN et al., 2018). Uma vez que a comercialização de agrotóxicos tem crescido e, segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG), em 2018 foram aplicadas 937,8 mil toneladas de agrotóxicos, e para 2019, com cerca de 993,2 mil toneladas, um aumento de 5,9%. Assim, o Manejo Integrado de Praga (MIP) juntamente com conhecimentos de taxonomia de biologia são fortes ferramentas na manutenção da população espécie de insetos-pragas em campo (GALLO, 2002; BENTO et al., 2016). No Brasil, o monitoramento populacional do moleque-da-bananeira, *Cosmopolites sordidus* e do bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis* são exemplos do sucesso de uso dos feromônios sintéticos (MESQUITA, 2003; PRAÇA, 2007).

De modo a entender o que cada mensagem química entre machos e fêmeas da espécie alvo pode significar, alia-se o estudo do comportamento animal com o estudo das estruturas químicas por estes insetos produzidos emitidos (VILELA; DELLA LUCIA, 1987; ZARBIN et al., 1999). Assim, conhecer o emissor e a bioatividade dos feromônios são os primeiros passos para identificação de um composto feromonal (FERREIRA; ZARBIN, 1998; ZARBIN, 1999). Geralmente são os machos entre os curculionídeos que emitem compostos feromonais, por exemplo, feromônios sexuais e de agregação (AMBROGI et al 2009; WYATT, 2014). Tais compostos são listados como monoterpenoides (caracteristicamente cíclicos), derivados de ácidos graxos, como os álcoois, cetonas e ésteres (FERREIRA;

ZARBIN, 1998; SEYBOLD; VANDERWEL, 2003; MOREIRA et al., 2005; ZARBIN et al., 2007; AMBROGI et al 2009). Em Curculionidae, a biossíntese dos compostos são geralmente partidas da via do metabolismo do ácido graxo ou via percursores de isoprenóides (TILLMAN et al., 1999; SEYBOLD; VANDERWEL, 2003).

Ao se realizar a comparação de pesquisas na área de feromônios em contraste com biodiversidade de curculionídeos de 50 mil espécies descritas (OBERPRIELER et al., 2007; STORK, 2017), a base de dados '*Pherobase'* sobre Feromônios e Semioquímicos, aponta atualmente o estudo de 55 gêneros representados por apenas 100 espécies, das quais somente 42 espécies tiveram evidenciados compostos marcados como feromônios (El-SAYED, 2020). Assim, ressalta-se a escassez e demanda de estudo na área.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o dimorfismo morfológico e a comunicação química a nível intraespecífico das coleobrocas *Eubulus* cf. *elongatus* Hustache, 1924 e *Pappista notaticeps* (Marshall, 1925), e a ênfase no comportamento de *Eubulus* cf. *elongatus* (Coleoptera: Curculionidae) para assim prover informações para elaboração de táticas de controle e/ou monitoramento dessas espécies.

3.1.1 Objetivos específicos

i. Investigar ocorrência de outra espécie de *Eubulus* sp. *além de Eubulus* cf. *elongatus* em cultivar de mandioca (*Manihot esculenta*): BRS 399;

ii. Identificar e caracterizar o dimorfismo interespecífico entre as espécies estudadas;

iii. Estudar o comportamento de atividade e sexual de *Eubulus* cf. *elongatus*;

iv. Investigar o dimorfismo sexual entre machos e fêmeas de *Eubulus* cf. *elongatus* e *Pappista notaticeps* (Coleoptera: Curculionidae);

v. Determinar a razão sexual das coleobrocas: *Eubulus* cf. *elongatus* e *Pappista notaticeps*;

vi. Implementar a técnica de coleta de voláteis sexo-específica para *Eubulus* cf. *elongatus* e *Pappista notaticeps*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DOS INSETOS E SUA MANUTEMÇÃO

Amostras de adultos de *Pappista notaticeps* coletados por armadilha de campo em plantios de pinhão-manso, e de adultos de *Eubulus* cf. *elongatus* também coletados por armadilhas iscadas com mandioca em áreas de lavouras comerciais de mandioca (cultivar BRS 399) em Planaltina, Distrito Federal, bem como pupas e adultos de *Eubulus* cf. *elongatus* cedidos da criação estoque do pesquisador Dr. Charles Martins de Oliveira da Embrapa Cerrados em Planaltina, Distrito Federal, Brasil, e em seguida foram enviados ao Laboratório de Semioquímicos da UFPR do Departamento de Química na Universidade Federal do Paraná (UFPR) na cidade de Curitiba, Paraná, Brasil.

Adultos de *P. notaticeps e E.* cf. *elongatus* foram mantidos em incubadoras do tipo BOD em condições de laboratório controladas (25 ± 1ºC; 70 ± 10%; Fotofase: 12h/ Escotofase: 12h). Os insetos foram alimentados com mandioca *ad libitum* em gaiolas plásticas (comprimento: 30; altura: 10; largura: 10 cm). Pupas de *Eubulus* cf. *elongatus* foram individualizadas em potes plásticos (diâmetro: 20; altura: 12 cm) e mantidos nas mesmas condições de laboratório. Após a emergência dos adultos, a dieta mandioca foi oferecida como alimento no diâmetro de 5 cm, sendo renovadas a cada 48 horas. Os adultos obtidos foram mantidos separados para uso posterior nos experimento, sendo a sexagem baseada na morfologia externa dos indivíduos provenientes do campo e/ou emergidos em laboratório foi realizada sob estereomicroscópio Quimis (10X - 40X) acopladas a câmera de 5 megapixels para o registro de fotos ver itens 4.2.2 e 4.2.3.

Amostras de adultos das espécies de coleobrocas do pinhão-manso e mandioca foram encaminhadas para confirmação das espécies pelo taxonomista em Curculionidae Dr. Germano Henrique Rosado Neto, da Universidade Federal do Paraná. A coleobroca do pinhão-manso foi determinada como *Pappista notaticeps,* enquanto para coleobroca da mandioca foi proposto *Eubulus* cf. *elongatus*. (FIELDER 1939; 1952).

4.2 ESTUDOS MORFOLÓGICOS DAS COLEOBROCAS *Eubulus cf. elongatus, Eubulus* sp. e *Pappista notaticeps*.

4.2.1 Avaliação do dimorfismo interespecífico das brocas-da-mandioca: *Eubulus* cf. *elongatus* e *Eubulus* (sp2)

Amostras de insetos adultos foram separadas por morfotipos e nomeadas em dois grupos: *Eubulus* cf. *elongatus* (N= 10) (sp1) e *Eubulus* (sp2) (N= 10) uma provável espécie nova que habita a mesma planta hospedeira. Caracteres morfológicos externos e das genitálias de machos (N= 10) foram registrados por imagens e capturadas via câmera Leica DFC 500 acoplada ao esteromicroscópio Leica MZ16 do "Taxonline - Rede Paranaense de Coleções Biológicas" da Universidade Federal do Paraná. As fotos obtidas foram tratadas via programa GIMP 2.8.22, um software livre (GIMP, 2007). Optou-se por utilizar a genitália de machos devido à baixa amostragem das fêmeas de *Eubulus* (sp2). A nomenclatura dos caracteres externos seguiu a metodologia proposta por Marvaldi; Lanteri (2005) e para preparação e nomenclatura das estruturas internas seguiu-se o proposto por Thompson (1992) e Santos e Rosado-neto (2010).

Além das análises morfológicas, o parentesco dos morfotipos 'sp1' e 'sp2' também foram testados via análise de DNA – PCR. Os primes utilizados foram obtidos através dos bancos de dados moleculares do GENBANK (National Center for Biotechnology Information (NCBI) e de literatura do BOLD (Barcode of Life Data System) (BENSON et al., 2014; RATNASINGHAM; HEBERT, 2007) para *Eubulus*. Os indivíduos utilizados eram originários de criação em laboratório. Com isso, utilizou-se a assinatura genética do gene citocromo oxidase 1 (*COI*). A análise genética dos indivíduos 'sp1' e 'sp2' foi realizada pela Startup GoGenetic (BALSANELLI et al., 2016) sediada na Universidade Federal do Paraná. Os dados obtidos das análises de DNA serão depositados e disponibilizados na plataforma pública de acesso a base de dados genéticos (GenBank ®).

4.2.2 Dimorfismo sexual da broca-da-mandioca, *Eubulus* cf. *elongatus*

A sexagem de broca-da-mandioca foi realizada somente para o morfotipo de *Eubulus* cf. *elongatus*, dos quais foram obtidos um número considerável de amostra,

seguindo a metodologia proposta por Barreto e Rosado-Neto (2012). Foram utilizadas amostras de machos (N= 30) e fêmeas (N= 30). A morfologia externa foi investigada via estereomicroscópio e imagens adquiridas via câmera Leica descrita anteriormente.

4.2.3 Dimorfismo sexual da broca-do-pinhão-manso: *Pappista notaticeps*

Para determinação do dimorfismo sexual da broca-do-pinhão-manso, *P. notaticeps* analisou-se as morfologias externas de amostras de machos (N= 30) e fêmeas (N= 30) adultos. A investigação da morfologia externa foi conduzida sob estereomicroscópio, e assim, possibilitou distingui-los sem danos para iniciar os estudos voltados à coleta de voláteis. Fotos foram registradas em microscópio eletrônico do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) para melhor evidenciar o dimorfismo encontrado. As imagens foram tratadas via GIMP 2.8.22. Para checagem da sexagem realizada dos adultos de *P. notaticeps*, foi utilizado o método descrito por Barreto e Rosado-Neto (2012).

4.2.4 Avaliação da razão sexual da coleobroca *Eubulus* cf. *elogantus e Pappista notacipes*

Para avaliação da proporção de machos e fêmeas de *Eubulus* cf. *elongatus* foram utilizados os insetos enviados entre o período de maio de 2017 a maio 2018 (N= 171), e julho de 2018 a julho 2019 (N= 341). As amostras de adultos de *P. notaticeps* seguiram a mesma data citada anteriormente e foram de 2017-2018 (N=53) e 2018-2019 (N= 87). Os insetos utilizados nesta etapa foram oriundos de áreas de coleta por armadilhas e criação em laboratório ver item 4.1 sobre obtenção dos insetos.

4.3 ESTUDO COMPORTAMENTAL DE *Eubulus* cf. *elongatus*

E. cf. *elongatus* foram acompanhados desde o período de pupa, sendo o qual possibilitou à obtenção de indivíduos virgens e de idade conhecida em laboratório, bem como a realização da investigação comportamental do ritmo circadiano e sexual.

4.3.1 Investigação do ritmo circadiano de *Eubulus* cf. *elongatus*

Amostra de indivíduos de *Eubulus* cf. *elongatus* recém-emergidos (N= 48) foram mantidos individualizados em recipientes (8 cm de altura x 10 cm largura), alimentados com pedaços de raiz de mandioca e mantidos sob condições controladas (25 ± 1 ºC; 70 ± 10%; Fotofase: 12h) até 15 ± 3 dias de vida. Foram sexados 20 machos e 20 fêmeas e distribuídas em quatro potes divididos por sexo, ou seja, cada pote conteve cinco machos e outras cinco fêmeas respectivamente (10 x 12 cm altura e largura). Depois de separados por sexo, foram alimentados com dieta natural (mandioca) *ad libitum*. Todos os recipientes utilizados neste experimento tiveram as laterais furadas (16 furos) (± 1 cm de diâmetro) para circulação de ar. Os potes foram cobertos com plástico filme de PVC (Policloreto de vinila) para facilitar as filmagens. Os recipientes com os grupos foram filmados por 96 horas para avaliação do ritmo circadiano. Os vídeos foram realizados via webcam (8 megapixels) acoplado ao notebook, e fotografias capturadas por uma câmera modelo Sony HSC 400. O experimento foi constituído de observação por 15 minutos de cada hora da fotofase e da escotofase. Em 24 horas de análise foram realizados 360 minutos de observação. Durante os quatro dias foram analisados 1440 minutos de dados, para machos e fêmeas. O caráter do estudo foi binomial, ou seja, ativo (movimentou-se pela arena durante período de análise) ou não ativo (não se movimentou pela arena durante o período de avaliação) e que levou em conta o fotoperíodo, fotofase versus escotofase. A construção da metodologia seguiu Altmann (1974).

4.3.2 Investigação do comportamento sexual de *Eubulus* cf. *elongatus*

Adotou-se a metodologia do item anterior (4.3.1) para a separação, condicionamento, filmagem e obtenção das imagens de *Eubulus* cf. *elongatus* alimentados a base da dieta natural (mandioca). Os indivíduos utilizados para este experimento eram virgens e tinham idade de 15 ± 3 dias de vida. Este período foi estimado como de maturação sexual, e foi embasado em trabalhos de biologia de curculionídeos (HOFFMAN; RAFFA, 1992; BARRETO-TRIANA, 2009; KAMIYA, 2015; UZAKAH, 2018). Foram filmados 20 casais durante a foto e escotofase de 12 horas por quatro dias, o que totalizaram 96 horas de filmagens. Assim, foi

investigado se a ocorrência de cópula poderia diferir entre os períodos, da fotofase versus escotofase. A avaliação constou das observações dos primeiros 15 minutos de cada fotoperiodo. Com a obtenção de imagens realizou-se também a descrição do comportamento de cópula. A nomenclatura adotada para descrição do etograma foi baseada em Yamamoto e coautores (2002).

4.4 TÉCNICA DE COLETA DE VOLÁTEIS

4.4.1 Coleta e obtenção dos extratos de macho e fêmeas das coleobrocas

Em condições controladas (25 ± 1ºC; 70 ± 10%; Fotofase: 12h) um grupo de 10 fêmeas e 10 machos de *P. notaticeps* e *E.* cf. *elongatus* foram separados por sexo e espécies e acondicionados em quatro câmaras de vidro (A: altura: 30 cm e diâmetro 20 cm) e (B: altura: 30 cm e diâmetro 30 cm) com dieta natural, ou seja, cada câmara conteve somente machos ou somente fêmeos da espécie (FIGURA 2). Em cada câmara foi oferecida dieta natural, pedaços de raiz de mandioca de cultivo orgânico (dez centímetros de comprimento) dispostas sob folhas de papel toalha.

Os extratos orgânicos voláteis obtidos de machos e fêmeas das presentes espécies foram originados a partir do sistema de areação (Figura 2C). O sistema de areação baseou-se em ar umidificado com água destilada, que seguidamente foi filtrado por carvão ativado. O ar tratado segue para as câmaras contendo somente machos e câmaras contendo somente fêmeas mais a dieta natural (1 L min^{-1}/ câmara). O ar que entra se destina à saída, a qual contém uma coluna de vidro (10 x 1 cm: altura x diâmetro em centímetros) com 20 miligramas de polímero adsorvente HayeSep Q 80–100 mesh (Althech, Lokeren, Belgium) para coletar os voláteis produzidos pela dieta e das respectivas espécies/sexo dos insetos.

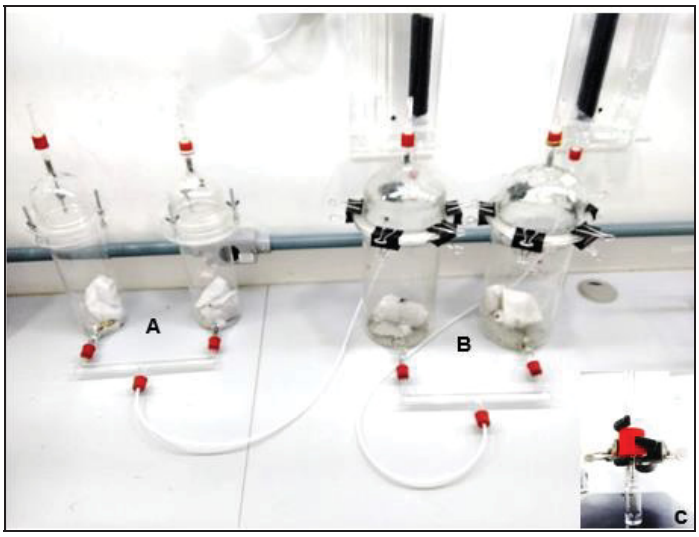


FIGURA 2 – Sistema de coleta de voláteis via areação por fluxo de ar em câmaras de vidro do tipo vertical. Machos e fêmeas do morfotipo de *Eubulus* cf. *elongatus* (A) e *Pappista notaticeps* (B) alimentados com raiz de mandioca envolvidos por papel toalha para absorção da umidade excessiva; coleta dos voláteis por sexo/espécie em vial de 2 mL com solvente (hexano) bidestilado (C).

No ciclo de 24 horas, as colunas foram retiradas e lavadas com 400 microlitros (µL) de solvente (hexano) bidestilado. As amostras obtidas foram acondicionadas em vials de 2 mililitros (mL) e devidamente etiquetadas com a data, nome da espécie, sexo e o número de indivíduos por câmara. Em seguida, as amostras passaram pela etapa de concentração com um fluxo de ar filtrado na vazão de 1 L min^{-1}, e então serem posteriormente analisadas. Para todos os preparos, coletas, extrações e análise dos voláteis seguiu-se a metodologia proposta por Zarbin et al (1999).

4.4.2 Análise dos extratos de machos e fêmeas das coleobrocas

Cada extrato concentrado, de machos e fêmeas de ambas as espécies foram analisados via a técnica de cromatografia gasosa ‘CG’ (GC 2010 – Shimadzu) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas ‘CG-EM’ (GC-MS-QP 2010 Plus – Shimadzu). O equipamento contou com uma coluna cromatográfica RTX-5 (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25 µm de espessura de filme; J&W Scientific, Folsom, Califórnia, EUA) alocado em um forno com parâmetros programáveis. Das amostras concentradas a 100 µL, foi utilizado 1 µL para cada extrato/análise em modo splitless. A configuração da temperatura do injetor foi de 250 ºC. A rampa de

temperatura utilizada foi com forno em 50 ºC por um minuto, elevando-se 7 ºC por minuto até 250 ºC, e mantendo-se por 10 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 1 mL minuto^{-1}.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliação do ritmo circadiano de macho e fêmea de *E.* cf. *elongatus*, foi utilizado o Modelo Linear Generalizado (MLG) com acesso aos pacotes da biblioteca (Mass effects; Multicomp; Anova Oneway e Tukey) via R. Studio 1.2.13 (RStudio, 2019) Para analisar se os eventos de cópula poderiam difere entre a fotofase e escotofase, utilizou-se o teste do Chi-quadrado, bem como para avaliar a razão sexual entre machos e fêmeas das coleobrocas estudadas. O valor de P utilizado foi de $P \leq 0.05$ e o programa BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2007). Para os períodos amostrados dos eventos de cópulas, os não acasalamentos não entraram na análise estatística.

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA INTERESPECÍFICA DAS BROCAS-DA-MANDIOCA *Eubulus* cf. *elongatus* ‘sp1’ e *Eubulus* ‘sp2’

As análises das genitálias de machos dos morfotipos de *Eubulus* cf. *elongatus* ‘sp1’e *Eubulus* ‘sp2’ revelaram uma morfologia diferenciada, qual machos de *Eubulus* sp. ‘sp2’ observou-se a presença de escleritos na região do aedeagus, ausentes totalmente para ‘sp1’. Para as duas espécies de *E.* cf. *elongatus* ‘sp1’ e *Eubulus* ‘sp2’, a espícula gastral apresentou grande semelhança exceto, pela base invertida em vista superior, assim estes dados sustenta a hipótese de serem espécies diferentes (Figura 3).

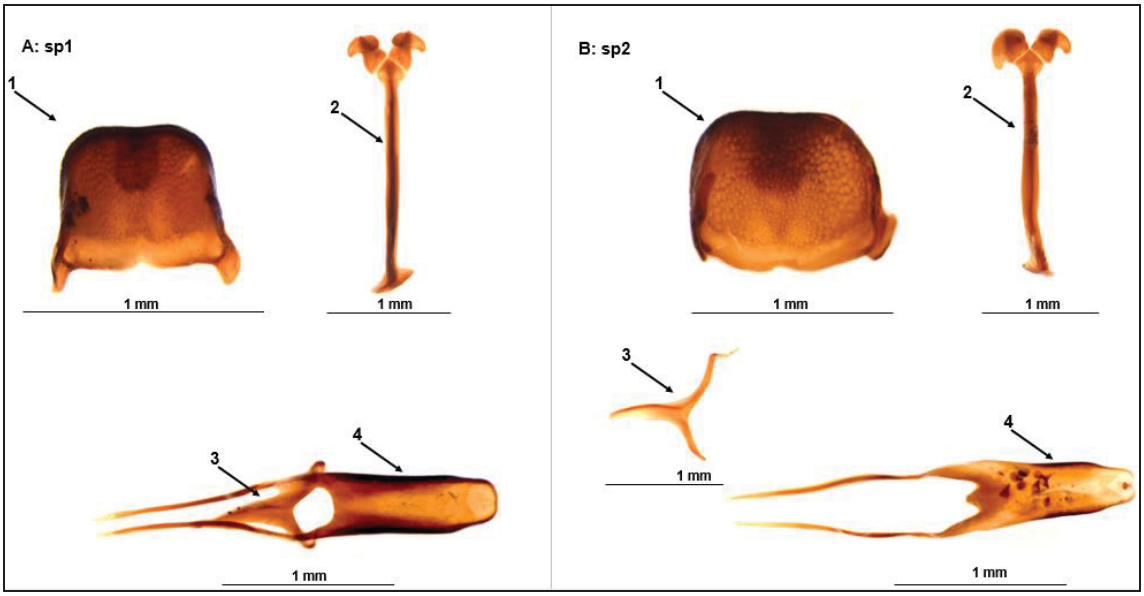


FIGURA 3 − Morfologia da genitália e do último tergo abdominal de machos dos morfotipos *Eubulus* cf. *elongatus* ‘sp1’ (A); *Eubulus* ‘sp2’ (B). Vista superior das genitálias de machos de *Eubulus* cf. *elongatus* e ‘sp2’. Setas indicam os segmentos: 1= 8º esternito abdominal; 2= Espícula gastral; 3= Tégmen; 4 = Aedeagus.

Uma vez investigado a morfologia interna para diferenciação das espécies, os resultados com os dados da morfologia externa revelaram caracteres particulares para cada espécie. Dentro dos indivíduos analisados, ficaram evidenciados que a tíbia do terceiro par de pernas uma dilatação no ápice para *E.* cf. *elongatus*, e para *Eubulus* sp. (Sp2) um formato arredondado das tíbias posteriores, o que se

constituiu um caráter externo importante para separação das espécies. Destaca-se especificamente a morfologia do ápice da tíbia posterior de ambos os exemplares (FIGURA 4).

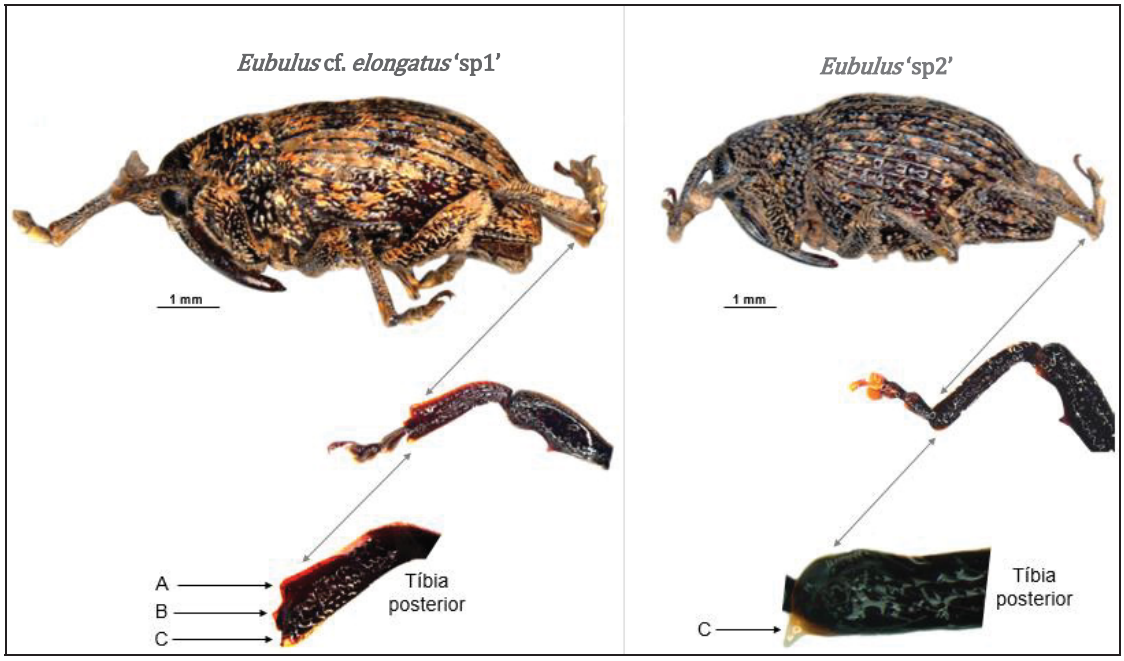


FIGURA 4 − Dimorfismo interespecífico das coleobrocas da mandioca. Vista lateral de *Eubulus* cf. *elongatus* e *Eubulus* 'sp2'. Em destaque, a perna posterior de ambos os indivíduos e o ápice da tíbia. Setas indicam o ápice da tíbia, onde: A= pré-mucro; B= espora 'dente'; C= Uncus.

As análises de DNA mitocondrial (COI) das amostras *Eubulus* 'sp1' apresentaram 86,06% de identidade (568/660 bases) para *Niphadomimus alcyone* Grebennikov, 2014 (Coleoptera: Curculionidae), enquanto as amostras batizadas de "sp2" revelaram 84,74% de identidade (561/662 bases) para *Eubulus parochus* (Coleoptera: Curculionidae) (Herbst, 1797) (FIGURA 5). Infelizmente, a identificação da espécie tornou-se inviável dentro das amostras utilizadas, pois não apresentaram um valor de decisão superior a 99%. Assim, o resultado das identidades ao nível de espécie para os morfotipos 'sp1' e 'sp2' foi inconclusivo. Contudo, os arranjos dos pares de base encontrados são diferentes, ou seja, os dados obtidos contribuem para o já evidenciado pela análise morfológica, a presença de duas espécies, que inclusive, habitam a mesma planta hospedeira.

FIGURA 5 − Sequenciamento genético das coleobrocas da mandioca: '*Eubulus* cf. *elongatus* (sp1) e *Eubulus* sp.'sp2'.

O apanhado de informações dos dados morfológicos e genéticos dos morfotipos *Eubulus* cf. *elongatus* e *Eubulus* sp. 'sp2' forneceram subsídios para separação destas espécies. A partir da separação dos morfotipos previamente estabelecidos e identificados como pertencentes ao gênero *Eubulus* utilizou-se a chave de identificação das espécies elaborada por Field (1939; 1952), assim, foi proposto *Eubulus* cf. *elongatus*, e para o morfotipo 'sp2', manteve-se como, *Eubulus* sp. para a qual sugerimos ser uma espécie nova. Assim, mais espécimes do morfotipo 'sp2' precisam ser avaliados e estudados, visto o baixo número amostral obtido.

5.2 INVESTIGAÇÃO DO DIMORFISMO SEXUAL DAS COLEOBROCAS: *Eubulus* cf. *elongatus* e *Pappista notaticeps*

As análises realizadas entre os grupos de machos (N= 30) e fêmeas (N= 30) de *P. notaticeps* revelaram uma característica morfológica externa e distinta entre os

sexos localizada no metaesterno (FIGURA 6). Os metaesternos das fêmeas se caracterizaram pela forma convexa, enquanto no metaesterno dos machos evidenciou-se uma depressão, ou seja, uma concavidade.

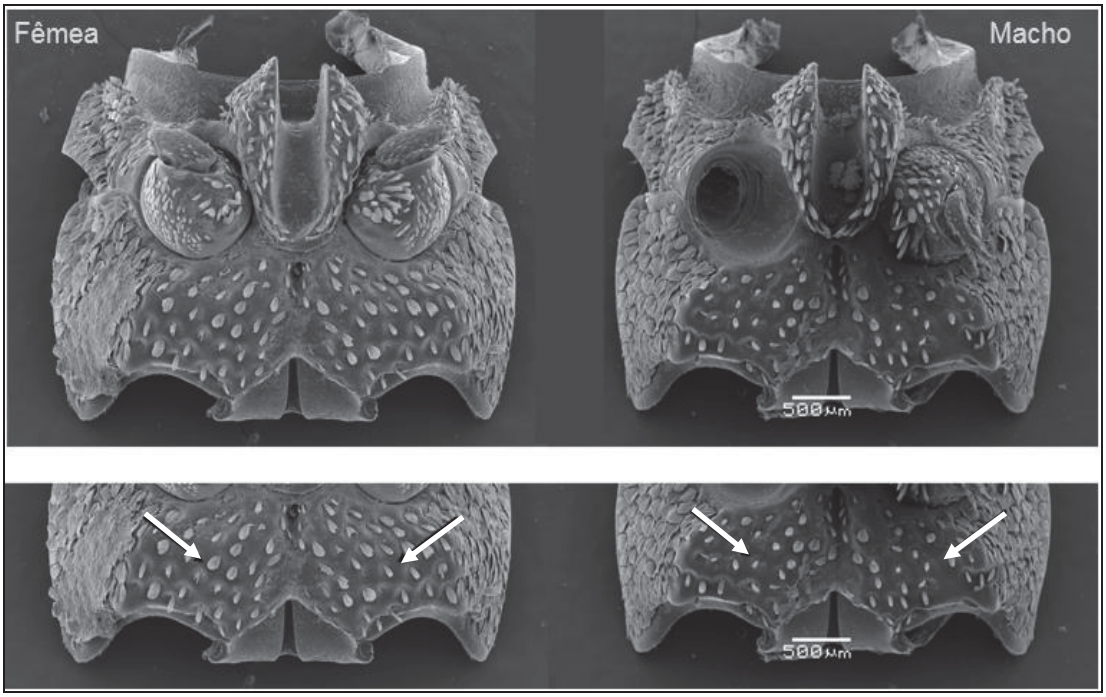


FIGURA 6 – Dimorfismo sexual de *Pappista notaticeps* na vista superior ventral. Fêmea à esquerda e macho à direita. Acima vista do esterno de ambos os sexos. Abaixo vista ampliada do metaesterno. As setas evidenciam o dimorfismo sexual encontrados para diferenciar as fêmeas (forma convexa) dos machos (forma côncava) de *P. notaticeps*.

Para as amostras investigadas da broca-da-mandioca de *E.* cf. *elongatus*, o dimorfismo sexual foi evidenciado no terceiro par de pernas. As análises morfológicas apontaram a região da tíbia de machos e fêmeas como um caráter de diferenciação entre os sexos. Para os machos, a tíbia apresentou da base ao ápice, um aspecto uniforme de desenvolvimento, enquanto que para as fêmeas, a tíbia começa em sua base de forma estreita, e ao decorrer do seu comprimento observou-se uma dilatação (FIGURA 7).

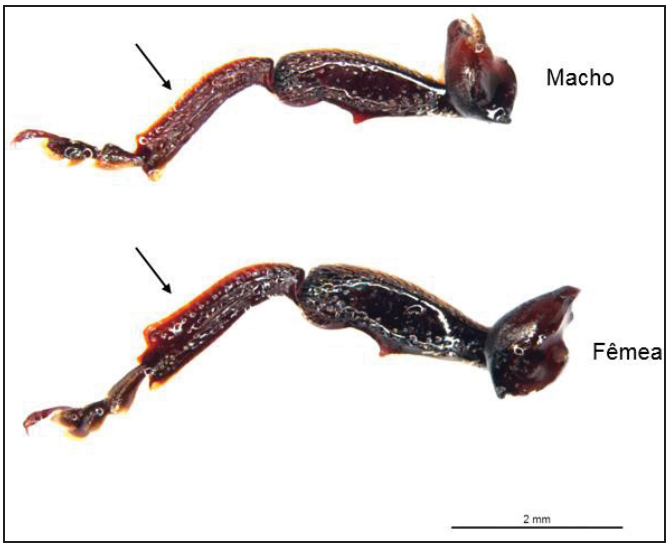


FIGURA 7 – Dimorfismo sexual de *Eubulus* cf. *elongatus* na vista lateral interna. Terceiro par de pernas do macho acima e da fêmea abaixo. Para fêmea, a seta aponta o alargamento da base ao ápice da tíbia no terceiro par de pernas para fêmea de *E.* cf. *elongatus*; o oposto pode ser observado pela seta indicada na tíbia do macho.

5.3 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DA COLEOBROCA-DA-MANDIOCA: *Eubulus* cf. *elongatus*

Os ensaios comportamentais do ritmo circadiano de *Eubulus* cf. *elongatus* resultaram na avaliação do período da fotofase e escotofase para ambos os sexos. Primeiramente, a comparação das amostras entre os sexos revelou uma similaridade comportamental durante os períodos de 12 horas da fotofase entre machos e fêmeas, e o mesmo foi observado dentro das 12 horas da escotofase. Contudo, o número de indivíduos ativos (eixo Y) versus cada fotoperíodo (eixo X) foi divergente entre os fotoperíodos (FIGURA 8). Na avaliação de somente fêmeas entre a fotofase e escotofase, pode-se observar com mais clareza que dentro das amostras avaliadas, há uma divergência significativa de atividade entre os fotoperíodos. Assim, os dados obtidos de machos e fêmeas evidenciaram uma atividade significativa para o período da escotofase.

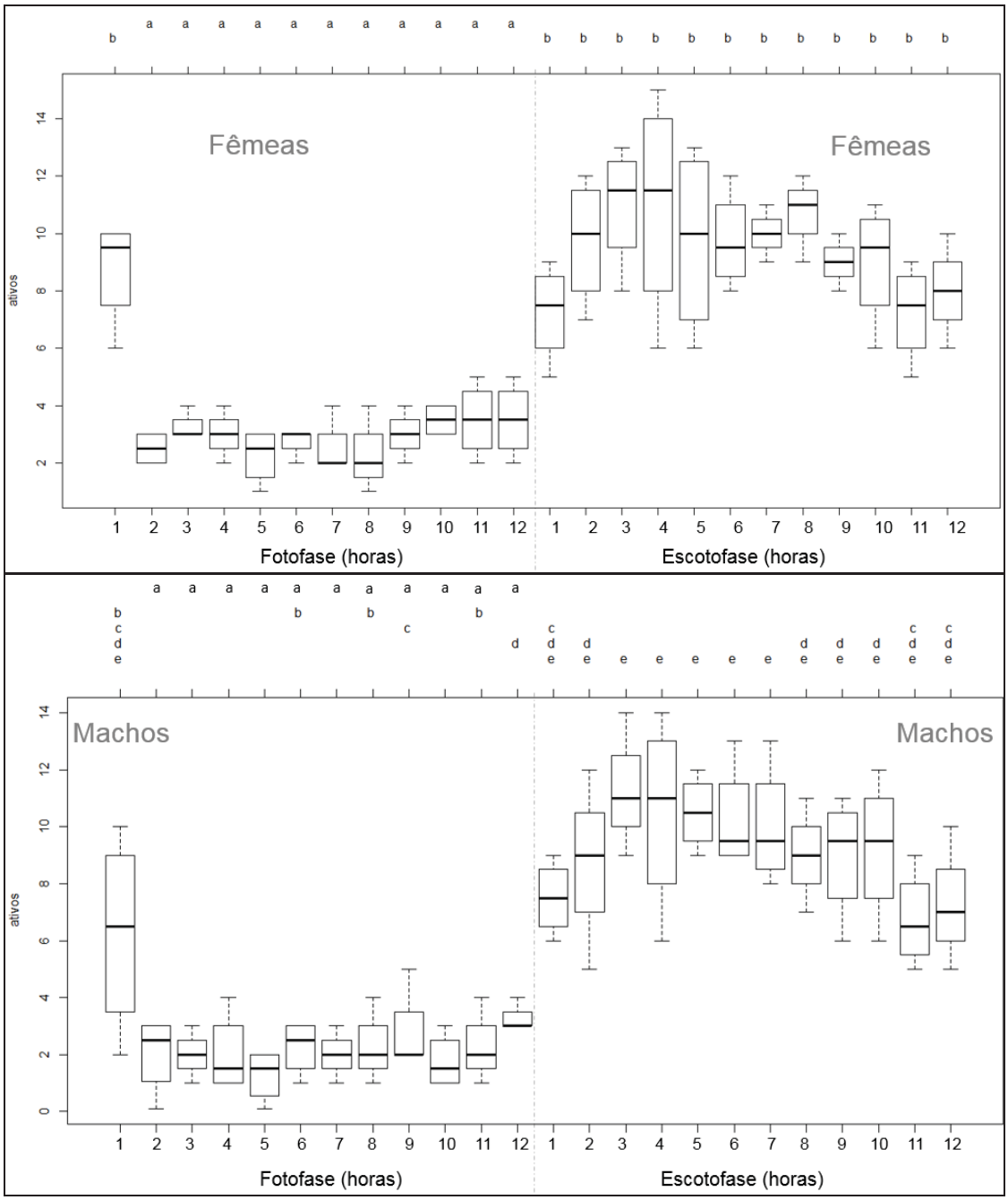


FIGURA 8 – Ritmo circadiano por sexo /fotoperíodo de *Eubulus* cf. *elongatus*. Ritmo circadiano de *E.* cf. *elongatus* na fotofase e escotofase de 12 horas cada. Fêmeas acima e de machos a baixo. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística via teste MLG com $P \leq 0.05$.

A seguir, os resultados obtidos do comportamento sexual apontaram que o comportamento de cópula ocorreu independente do fotoperíodo, ou seja, tanto na fotofase quanto na escotofase. Nas análises dos eventos de cópula comparando os fotoperíodos de 12 horas e avaliando os 15 minutos de cada hora não observou diferença estatística pelo teste do Chi-quadrado 1.68 P= 0.25 (FIGURA 9).

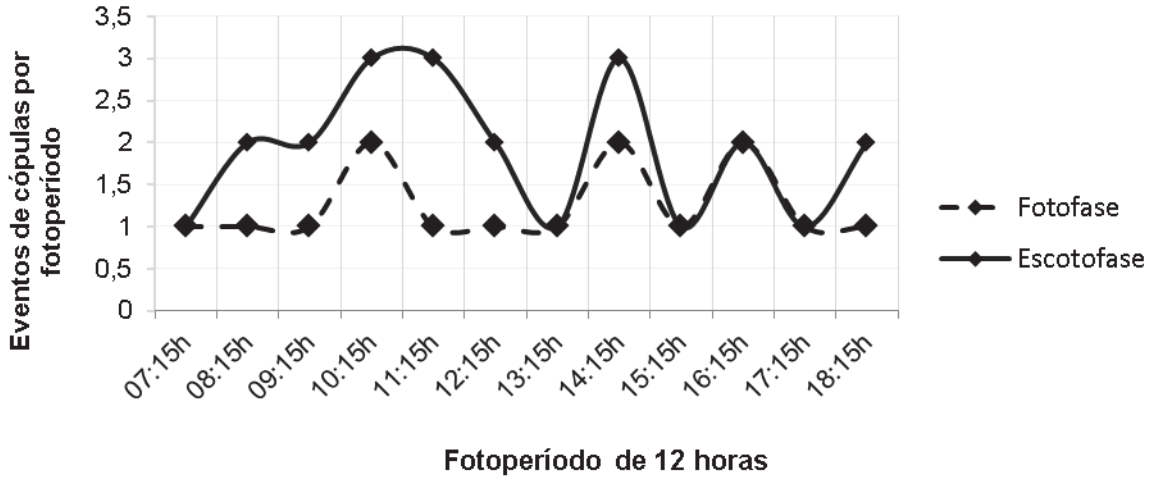


FIGURA 9 – Número total de cópulas ocorridas de casais de *Eubulus* cf. *elongatus* entre a fotofase e escotofase de 12 horas cada e acompanhada por quatro dias.

Basicamente, o comportamento de cópula desta espécie foi dividido em quatro etapas: pré-cópula; cópula, pós-cópula e guarda (FIGURA 10 = 1°- 4°). Nas imagens tomadas para descrever o comportamento de cópula foi destacado por machos realizaram o denominado 'comportamento de guarda'. O comportamento foi caracterizado por machos que após a cópula mantiveram-se no dorso da fêmea por um longo período (± 4 horas). Este comportamento foi observado em todas as cópulas ocorridas independente do fotoperíodo.

O etograma geral iniciou-se com o encontro do macho com a fêmea e em seguida subindo no seu dorso (FIGURA 10 = 1°). As pernas anteriores apoiam-se no pronoto da fêmea com a utilização dos uncus, estrutura em formato de gancho utilizado para fixação (FIGURA 10 = 2°). Com o par de pernas posteriores, a esquerda funcionou como um apoio, enquanto a perna posterior direita, mais especificadamente a região tarsal, desencadeia um processo de repetitivos toques, aqui denominado de "corte" para que ocorra a cópula. Em outras palavras, a região tarsal da perna posterior direita dos machos realiza repetitivos toques nos uroesternitos do segmento abdominal da fêmea (FIGURA 10 = 2º e 3º), nesta etapa ocorre a inserção do *aedeagus* (FIGURA 10 = 3°). Por volta de 30 minutos depois ocorre a retirada do *edeagus* e inicia-se o comportamento de guarda (FIGURA 10 = 4°). Todas as etapas entre o 1° ao 3° estágio ocorreram geralmente entre 30 minutos a 1 hora, já o comportamento de guarda durou períodos superiores a 4 horas.

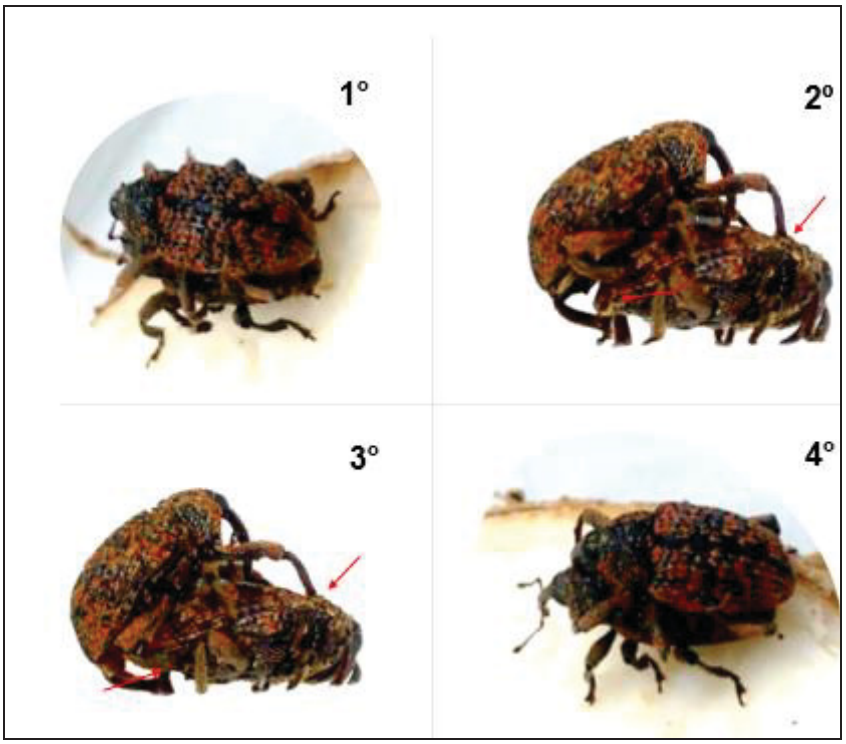


FIGURA 10 – Etograma do comportamento de cópula de *Eubulus* cf. *elongatus*. Etograma de cópula. Setas em vermelho indicam o posicionamento dos apêndices locomotores, pernas anteriores e posteriores. 1°= encontro e monta; 2º= macho sobre o dorso da fêmea, com as pernas anteriores (região do uncus) fixa-se no pronoto da fêmea; 3º= Cortejo e inserção do *aedeagus*; 4º= retirada do *aedeagus* e comportamento de guarda.

5.4 RAZÃO SEXUAL DA COLEOBROCA DA MANDIOCA *Eubulus* cf. *elongatus* e *Pappista notaticeps*

A razão sexual das amostras de *E*. cf. *elongatus* referentes aos anos base 2017 e 2018 divergiram entre si. Para o ano base de 2017 evidenciou-se uma diferença estatística pelo teste do qui-quadrado = 6.76 e *P*= 0.009 entre a proporção amostrada maior de machos que de fêmeas. Ao amostrar 1.5 machos para cada fêmea. Entretanto, para o ano base de 2018 a razão sexual observada não evidenciou divergência estatística entre a proporção de machos e fêmeas pelo teste do qui-quadrado = 1.98 e *P*= 0.1591 revelando uma proporção próxima de 1: 1 de machos para fêmeas (FIGURA 11).

Para os indivíduos denominados de *Eubulus* ‘sp2’ a coleta destes espécimes foi relativamente muito baixa (N= 30), estimou-se uma proporção de 10:1 entre *E*. cf. *elongatus* para ‘*Eubulus* ‘sp2’ respectivamente.

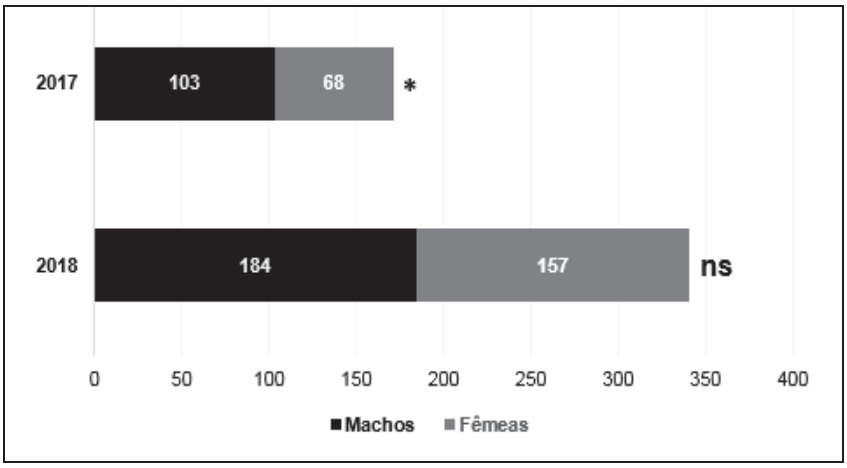


FIGURA 11 – Proporção de machos e fêmeas de *Eubulus* cf. *elongatus*. Número total de insetos sexados. (*) dados significativos p< 0.01. Dados não significativos (ns).

Para a broca-do-pinhão-manso, *P. notaticeps*, ambas as amostras sondadas de 2017 (qui-quadrado: 0.302 e *P*= 0.58) e para 2018 (qui-quadrado: 0.334 *P*= 0.39) não apresentaram uma diferença significativa na proporção analisada das amostras de machos e fêmeas, ou seja, uma proporção próxima de 1.2 machos para cada 1 fêmea (FIGURA 12).

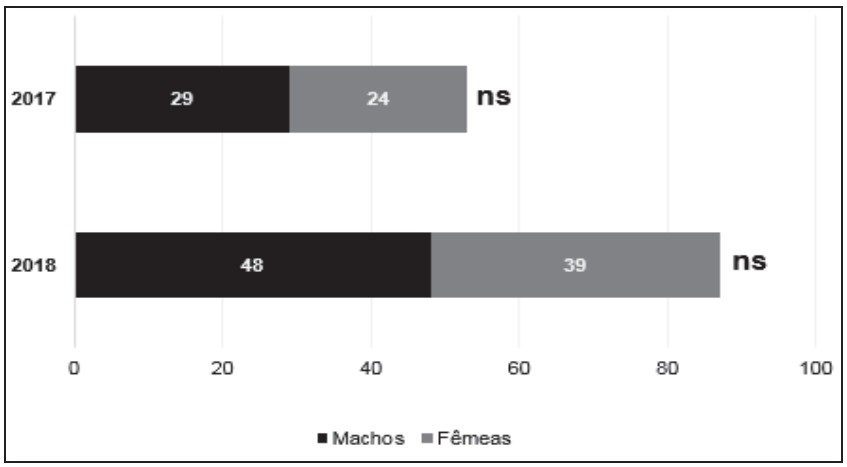


FIGURA 12 – Proporção de machos e fêmeas de *Pappista notaticeps.* Número total de insetos sexados de *P. notaticeps*. Dados não significativos (ns).

5.5 COLETAS DE VOLÁTEIS DAS ESPÉCIES *Eubulus* cf. *elongatus* e *P. notaticeps*

A coleta de 60 extratos das câmaras com 10 machos e fêmeas da broca-da-mandioca *E.* cf. *elongatus* realizadas durante a presente tese, infelizmente, não

evidenciaram nenhum composto sexo-específico candidato a feromônio. Observa-se no cromatograma a seguir a comparação das análises do extrato bruto obtido de machos e fêmeas durante o ciclo de 24 horas de coleta de *E*. cf. *elongatus* (FIGURA 13 - A). Para *P. notaticeps,* avaliaram-se 40 extratos coletados e analisados de machos e fêmeas no mesmo método para *E.* cf. *elongatus,* que também não evidenciaram nenhum composto sexo-específico dentro das amostradas obtidas, como pode ser observado a seguir (FIGURA 13 - B).

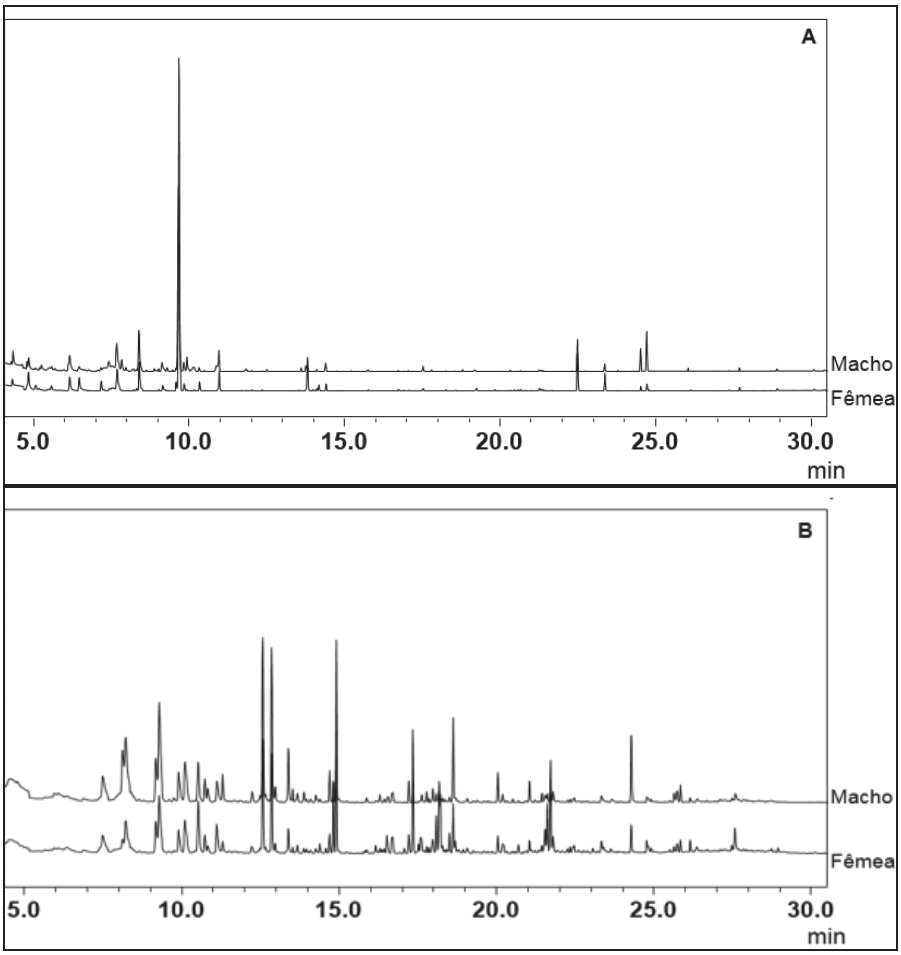


FIGURA 13 – Comparação dos cromatogramas oriundos dos Voláteis Coletados de Machos e Fêmeas de *Eubulus* cf. *elongatus* (A) e *Pappista notaticeps* (B) Análise de cromatografia em fase gasosa dos extratos de machos (acima) e fêmea (abaixo) das coleobrocas alimentadas com dieta natural (mandioca); Amostragem de 24 horas por extrato.

6. DISCUSSÃO

Os resultados da presente pesquisa evidenciaram a importância da junção dos dados morfológicos, moleculares e do comportamento das espécies de coleobrocas, *Eubulus* cf. *elongatus*, *Eubulus* sp. 'sp2' e *Pappista notaticeps*. Este trabalho fornece informações inéditas para esse grupo de Curculionidae de interesse agrícola que auxiliarão na elaboração de táticas de monitoramento e manejo das espécies. Com isso, possibilita também entender processos relacionados com a bioecologia, especiação e de variações genéticas de complexos de espécies, e ainda no Manejo Integrado de Pragas (MIP) (GALLO et al., 2002; PAGE et al., 2005; ARMSTRONG; BALL, 2005; ASCUNCE et al., 2008; ASTRIN; STÜBEN, 2011; JINBO et a., 2011).

A morfologia externa dos exemplares analisados de *E.* cf. *elongatus* e *Eubulus* 'sp2' foram semelhantes, exceto pela característica da tíbia. Já as análises das genitálias dos morfotipos amostrados se mostraram com claras evidencias de divergência. Rosado-Neto e Marques (1996) demostraram que pela análise dos caracteres morfológicos de duas espécies consideradas crípticas de *Gonipterus gibberus* Boisduval, 1835 e *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal, 1833 (Coleoptera: Curculionidae), que as genitálias masculinas apresentaram diferenças na região da espícula gastral e na presença de esclerito. Vidal (1955) também evidenciou esta diferença em *G. gibberus e Gonipterus platensis* (Marelli, 1926). Dados morfológicos e moleculares (ex. COI) mostraram-se como importantes ferramentas para auxiliar a separação do complexo de espécies-praga críptica da cultura do eucalipto pertencentes ao gênero *Gonipterus* Schoenherr, 1833 (Coleoptera: Curculionidae) (MAPONDERA et al., 2012).

A diferença nas tíbias posteriores de *E.* cf. *elongatus* e *Eubulus* sp. 'sp2' subsidiaram a separação das espécies, e inclusive na descrição do carácter de dimorfismo sexual para *Eubulus* cf. *elongatus*. De forma semelhante, a morfologia da tíbia de *Rhyssomatus subtillis* Fiedler, 1937 (Curculionidae: Molytinae) evidenciou que as protíbias de fêmeas apresentaram o mucro e uncus, enquanto nos machos há a ausência do uncus (CAZADO et al., 2014), o que respaldam a morfologia da tíbia em estudos de cunho intraespecífico e/ou interespecífico em Curculionidae (VAURIE, 1964; JOHNSON-CICALESE et al., 1990; THOMPSON, 1992; ELLER,1995; MARVALDI; LANTERI, 2005; PRENA; WHITEHEAD, 2012; CAZADO

et al., 2014; ANZALDO, 2017). Com isso, endossam-se os estudos morfológicos e sua importância na determinação do dimorfismo sexual, etapa imprescindível, por exemplo, no estudo da emissão feromonal.

Sobre os caráteres intraespecíficos morfológicos de *E.* cf. *elongatus* e *P. notaticeps*, os resultados atingidos possibilitaram a realização da sexagem das espécies. De acordo com o observado para o grupo, o dimorfismo sexual externo pode ser variado e ainda ser encontrado em diferentes partes do corpo de um curculionídeo, por exemplo, antena, rostro ou abdômen, como observado para *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922; *Onchoscelis germari* (Boheman, 1837); *Cratosomus flavofasciatus* (Guerin, 1844) e *Aubeonymus mariaefranciscae* (Roudier, 1881) (ver. PÉREZ; SANTIAGO-ALVAREZ, 1981; SILVA-FILHO et al., 2007; BARRETO; ROSADO-NETO, 2012; CAMPOS, 2017). Nos adultos de *P. notaticeps* observou-se o dimorfismo na região do metaesterno, côncava (machos) e convexa (fêmeas). Registros de formações côncavas e convexas também são marcados como dimorfismo sexual em *C. flavofasciatus* e *A. mariaefranciscae,* nos quais evidenciaram as regiões ventrais dos esternitos (uroesternitos abdominais) côncava para machos, enquanto para fêmeas uma forma convexa (PÉREZ; SANTIAGO-ALVAREZ, 1981; CAMPOS, 2017).

O curculionídeo *E.* cf. *elongatus* apresentou diante os dados obtidos uma preferencia pelo fotoperiodo noturno de 12 horas para uma maior atividade. O hábito noturno de atividade e/ou cópula também tem sido relatado em outras espécies, cita-se *Cosmopolites sordidus, Conotrachelus nenuphar* (Herbst, 1797) e *Hylobius abietis* L. 1758 (RACETTE, et al., 1991; FEDDERWITZ et al., 2014; UZAKAH, 2018). Com isso, pode-se associar o hábito de vida de *E.* cf. *elongatus*, pois o estágio de larva e pupa são realizados no solo, dentro de raízes de mandioca (OLIVEIRA et al., 2019). Em observações de laboratório, os adultos alimentados com raízes de mandioca realizavam galerias internas e durante o período da escotofase iniciavam a atividade de locomoção, corroborando com os dados observados no experimento de ritmo circadiano da espécie em laboratório. De um modo geral, os fatores que governam o hábito de vida de uma espécie podem ser variados, seja um fator endógeno, por exemplo, genético, fisiológico, ou exógeno, como condições ambientais (BECK, 1980; SAUNDERS, 2009). Saunders et al. (2002) relatou que espécies de hábito troglóxenos podem apresentar um ritmo circadiano definido, bem como insetos que

se desenvolvem no interior da planta hospedeira, o que pode corroborar com o habito de vida e ritmo circadiano de observado para *E*. cf. *elongatus*.

O presente estudo do comportamento de cópula de *Eubulus* cf. *elongatus* foi o primeiro trabalho de comportamento com o gênero para região Neotropical. Para uma espécie norte-americana, *Eubulus parochus* (Herbst, 1797), dados de campo apontam o hábito gregário para alimentação e cópula (HALIK; BERGDAHL, 2006). Seja para região Neotropical ou Paleártica, o grupo ainda demanda extensos estudos, são mais de 100 espécies mundo (FIELDER, 1939; WIBMER; O'BRIEN, 1986; ANDERSON, 2008). O etograma apresentado de cópula de *E.* cf. *elongatus* pode ser divido em três importantes eventos, pré-cópula, cópula e pós-cópula. Na pré-cópula, o encontro do parceiro sexual, pode incluir pistas visuais, sonora e pista odorífera de curto e/ou longo alcance (GIBSON, 1967; AMBROGI et al., 2009; MARTINS et al., 2013). Por exemplo, a emissão de feromônios, e a produção de compostos cuticulares no comportamento de cópula, isto é, no reconhecimento do parceiro sexual (MUTIS et al., 2009; AMBROGI et al., 2009; MARTINS et al., 2013).

Entre o período de pré-cópula e cópula observou-se em *E.* cf. *elongatus* o desencadeamento do comportamento de "corte" realizado pela perna posterior de machos em contato com os uroesternitos das fêmeas, e interessantemente, tal comportamento tem sido descrito de forma similar para outras espécies, como o evidenciado para *Sitophilus zeamais* (Motsch., 1855), *Aegorhinus superciliosus* (Guerin, 1830), *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire, 1849) e *Cosmopolites sordidus* Germar (WALGENBACH; BURKHOLDER, 1987; SATO; KOHAMA, 2007; MUTIS et al., 2009; UZAKAH; ODEBIYI, 2015). Até o presente momento, não há esclarecimentos detalhados na literatura sobre a função desse comportamento em Curculionidae. Nesse sentido, sugere-se que o comportamento de corte realizado por machos possa estar relacionado com escolha da fêmea, o que pode ser sustentado pela '*cryptic female choice*' = escolha enigmática da fêmea (EBERHARD, 1997). Em laboratório observou-se que machos de *E.* cf. *elongatus* quando somente subiam no dorso da fêmea, a cópula era evitada e/ou não ocorria; o que de forma semelhante foi observado para *Cosmopolites sordidus* (UZAKAH; ODEBIYI, 2015). Carbone e Rivera (1998) apontam que longos períodos de cópula observados em *Gonipterus scutellatus* também estariam relacionados à seleção sexual e à escolha enigmática da fêmea. Nós podemos inferir que o comportamento de toque 'corte' seja um fator importante no acasalamento da espécie.

O comportamento de guarda para Molytinae tem sido notado para várias espécies (LYAL, 2014), e com isso, poderia garantir a paternidade após a cópula (EBERHARD, 1997). Embora machos no período pós-cópula tenham realizado o comportamento de guarda, o presente trabalho não avaliou a presença de um macho rival, o que poderia influenciar tal comportamento. Porém, mesmo em arena sem rival, o macho dispendeu um tempo considerável no dorso da fêmea, acima de quatro horas.

Sobre a razão sexual de *E.* cf. *elongatus* amostrada*,* em 2017 foi a que apresentou diferença estatística entre a proporção de machos e fêmeas, embora tenham sido oriunda de uma população consideravelmente menor. Contudo, em 2018, a razão sexual observada (1:1) para *E.* cf. *elongatus* e *P. notaticeps* foram próximas da esperada, uma razão de 1:1, sendo 1 fêmea para 1,18 machos de *E.* cf. *elongatus*. Dados da literatura para *Spermologus rufus* Boheman, 1843 relatam uma proporção de 1 fêmea para 1,3 machos, e para 682 espécimes de *Cryptorhynchus lapathi* sexados uma proporção 1:1 (HARRIS; COPPEL, 1967; BARRETO; ANJOS, 1999); e semelhantemente encontrado para outras espécies de curculionídeos, como *Hylobius radicis* Buchanan, 1935 e *H. pales* (Herbest, 1797) e para *Eustenopus villosus* (Boheman, 1843) (HUNT et al., 1992; FORNASARI; SOBHIAN, 1993). Assim, possivelmente a proporção esperada e observada pode estar correlacionada com à razão sexual (SCHULZ-SCHAEFFER, 1980). De acordo com Smith (1950), em Curculionidae machos e fêmeas apresentam geralmente o sistema XY: XX, respectivamente. Portanto, a razão sexual entre machos e fêmeas estaria dentro de 50%.

Análises das amostras dos extratos de compostos orgânicos voláteis coletados para ambas as espécies, de machos e fêmeas separadamente, não evidenciaram nenhum composto sexo-especifico candidato a feromônio. Entretanto, em Curculionidae tem sido observado os machos como emissores de compostos sexo-especifico e majoritariamente caraterizados como feromônios de agregação (FERREIRA; ZARBIN, 1998; AMBROGI et al., 2009), e também a ocorrência de espécies emissoras de sons pela combinação élitro-tergo (GIBSON, 1967; ROSADO-NETO; SANTOS, 2010).

A fase de coleta dos odores de machos e fêmeas pode ser realizada pelo método de areação durante uma de faixa de 24 horas (ZARBIN et al., 1999). Como o preconizado para este trabalho, durante a coleta dos voláteis pelo método de

areação, e o fator que mais influenciou a efetividade da coleta, segundo o autor, foi a dieta natural. A dieta constituída de mandioca orgânica durante a coleta dos voláteis apresentou uma alta taxa de decomposição, mesmo a troca ocorrendo dentro da faixa de 24 horas. Ademais, os insetos possuem o hábito de adentrar no interior da dieta (mandioca), enquanto por fora ocorria a decomposição acelerada. Com isso, a troca da dieta envolvia perturbação dos insetos, o que poderia de alguma maneira, ter afetado o comportamento bem como a emissão de compostos feromonais das espécies. Porém, de uma forma geral, o presente estudo evidenciou o ritmo circadiano de locomoção e comportamento sexual de adultos de *E.* cf. *elongatus* no período noturno. Desse modo, pode-se sugerir uma busca pelo parceiro sexual mediado por feromônios e sons via estridulação no período noturno, e que ainda pode-se correlacionar como um período da maior emissão feromonal.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, os elementos obtidos pela morfologia e dados moleculares possibilitaram a separação a nível intra e interespecífico das coleobrocas da mandioca *Eubulus* cf. *elongatus* e *Eubulus* sp. ‘sp2’ e da broca-do-pinhão-manso, *Pappista notaticeps.* Dados complementares de comportamento lançaram luz sobre atividade de locomoção e sexual em *E. elongatus* em laboratório. A avalição da razão sexual contribui para uma percepção e projeção futura da flutuação populacional das espécies em campo. Por fim, ambos os dados são valiosas informações para compreensão de espécies tidas como pragas agrícolas, e com isso, pode-se salientar a grande importância de estudos unindo a morfologia, genética e comportamento de espécies de interesse agrícola para um melhor entendimento que visem seu monitoramento e/ou controle, bem como servir de base para estudos posteriores em Ecologia Química.

7.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sobre recomendações futuras, observa-se agora um cenário que possibilitará e facilitará o estudo envolvendo a ecologia química de *Eubulus elongatus*, uma vez que se pavimentaram sólidos dados morfológicos para separação intra e interespecífica das espécies de *Eubulus* que foram reportadas atacando o cultivo de

mandioca em Planaltina Distrito-Federal. Com isso, um aprofundamento dos dados comportamentais de cópula, por exemplo, a influência de um macho rival no comportamento de guarda e o papel dos hidrocarbonetos cuticulares no comportamento de cópula são necessários e ainda desconhecidos para o gênero. Por fim, a elaboração de uma dieta à base de mandioca poderia auxiliar a coleta de voláteis em laboratório.

8. REFERÊNCIAS

ADEBOWALE, K. O.; ADEDIRE, C. O. Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, p. 901, 2006.

AGUIAR P. A. et al. Insecta. In: BOEGER, WALTER A; ROCHA, MOREIRA R. Estado da Arte e Perspectivas para a Zoologia no Brasil, p. 296. 2009.

ALONZO-ZARAZAGA, M. A.; LYAL, C. H. C. A world catalogue of families and genera of Curculionoidea (Insecta: Coleoptera) (Excepting Scolytidae and Platypodidae). **Entomopraxis. Barcelona, Spain**, 1999.

ALTMANN, J. Observational study of behavior: sampling methods. **Behaviour**, v. 49, n. 3-4, p. 227-266, 1974.

AMBROGI, B. G.; ZARBIN, P. H. G. Aggregation pheromone in *Sternechus subsignatus* (Coleoptera: Curculionidae): olfactory behaviour and temporal pattern of emission. **Journal of Applied Entomology**, v. 132, n. 1, p. 54-58, 2008.

AMBROGI, B. G. et al. Feromônios de agregação em curculionidae (insecta: coleoptera) e sua implicação taxonômica. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2151-2158, 2009.

AMBROGI, B. G. et al. Identification of male-produced aggregation pheromone of the curculionid beetle *Sternechus subsignatus*. **Journal of chemical ecology**, v. 38, n. 3, p. 272-277, 2012.

ANDERSON, R. S. 131. Curculionidae Latreille 1802. **American beetles**, v. 2, p. 722-815, 2002.

ANDERSON, R. S. A review of the genus *Eubulus* Kirsch 1869 in the United States and Canada (Curculionidae: Cryptorhynchinae). **The Coleopterists Bulletin**, v. 62, n. 2, p. 287-296, 2008.

ANZALDO, S. S. Review of the genera of Conoderinae (Coleoptera, Curculionidae) from North America, Central America, and the Caribbean. **ZooKeys**, n. 683, p. 51, 2017.

ARMSTRONG, K. F.; BALL, S. L. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1813-1823, 2005.

ASCUNCE, M. S. et al. Mitochondrial nucleotide variability in invasive populations of the root weevil *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) of Florida and preliminary assessment of Diaprepes sp. from Dominica. **Journal of economic entomology**, v. 101, n. 4, p. 1443-1454, 2008.

ASTRIN, J. J.; STÜBEN, P. E. Molecular phylogeny of *Echinodera* and *Ruteria* (Coleoptera: Curculionidae: Cryptorhynchinae) and the parallel speciation of Canary Island weevils along replicate environmental gradients. **Invertebrate Systematics**, v. 24, n. 5, p. 434-455, 2011.

BAILEZ, O. E. et al. Life-history of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae), under laboratory conditions. **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 2, p. 203-207, 2003.

BALSANELLI. et al. **GoGenetic**. Acessado em 19 de mar. 2020. Disponível em: https://www.gogenetic.com.br/sobre/>. 2016.

BARRETO, M. R; ROSADO-NETO, G. H. Dimorfismo Sexual de *Onchoscelis germari* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae). **EntomoBrasilis**, v. 5, n. 3, p. 242-245, 2012.

BARRETO, M. R.; ANJOS, N. *Spermologus rufus* Boheman 1843 (Coleoptera: Curculionidae). **Ciência e Agrotécnica**, v. 23, p. 358-364, 1999.

BARRETO-TRIANA, N. C. **Comportamento sexual e reprodutivo de** *Sphenophorus levis* **Vaurie, 1978 (Coleoptera**: Curculionidae) em cana-de-açúcar. 2009. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009. Disponível em: < doi:10.11606/T.11.2009.tde-15042009-074911>. Acessado em: 18 de out 2020.

BECK, S. D. **Insect photoperiodism.**, Academi C Press, Inc (London). p. 391. 1968.

BELLOTTI, A.; VAN, S. A. Mite and insect pests of cassava. **Annual Review of Entomology**, v. 23, n. 1, p. 39-67, 1978.

BELLOTTI, A. C. et al. Origin and management of neotropical cassava arthropod pests. **African Crop Science Journal**, v. 2, n. 4, p. 407-417, 1994.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic acids research**, v. 43, n. Database issue, p. D30-5, 2014.

BERGMANN, J. et al. Synthesis of pheromones: Highlights from 2005-2007. **Current Organic Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 683-719, 2009.

BERGSTROM, G. Chemical ecology = Chemical + Ecology. **Pure Appl**. Chem, v. 79, n. 12, p. 2.305-2.323, 2007.

AYRES, M. et al. BioEstat. **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências Biomédicas.** Versão, v. 5, 2007.

BOLD. Barcode of Life Data System. Disponível em: <http://www.barcodinglife.org/index.php/Public_SearchTerms>. Acessado em: 05 de nov. 2020.

BOTELHO, M. G. L. et al. Agrotóxicos na agricultura: agentes de danos ambientais e a busca pela agricultura sustentável. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. 25, 2020.

BUTENANDT, A. et al. On the sex pheromone of the silkworm moth *Bombyx mori*. Isolation and structure. **Z Naturforsch B**, v. 14, p. 283-284, 1959.

BRAIBANTE, M. E. F; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. **Química nova na escola**, v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.

BRESSAN, E. A. **Variabilidade genética e estimativa da taxa de cruzamento do pinhão manso (Jatropha curcas L.) empregando marcadores moleculares**. 2011. 210 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011. Disponível em: https://bit.ly/30FmpZI. Acesso em: 06 de out. 2020.

CAMPOS, P. C. S. et al. Morfometria geométrica, dimorfismo sexual e avaliação da atratividade de *Cratosomus flavofasciatus* (Coleoptera: Curculionidae) ao feromônio sintético. 2017. 68 f. Dissertação (Mestrado Ecologia e Conservação) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2017. Disponível em: https://ri.ufs.br/jspui/handle/riufs/4460

CARBONE, S. S; RIVERA, A. C. Sperm competition, cryptic female choice and prolonged mating in the Eucalyptus Snout-Beetle, *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera, Curculionidae). **Etologia**, 6: 33-40, 1998.

CARELS, N. *Jatropha curcas*: a review. **Advances in botanical research**, v. 50, p. 39-86, 2009.

CASARI, S. A.; IDE, S. **Coleoptera Linnaeus, 1758**. In: Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia. JA Rafael; GAR Melo; CJB Carvalho, Editora: Holos, p. 454-535, 2012.

COSTA-LIMA, AM. Insetos do Brasil. 10 Tomo, coleópteros, 4ª. e última parte. **Esc. Nac. de Agron. Série Didática**, nº12, 1956.

CAZADO, L. E. et al. Sexual Dimorphism of *Rhyssomatus subtilis* (Coleoptera: Curculionidae). **Florida Entomologist**, v. 97, n. 4, p. 1812-1815, 2014.

CREPALDI, I. C. Origem, evolução e geografia da mandioca: uma revisão. **Sitientibus, Feira de Santana**, n. 10, p. 89-94, 1992.

DA ROCHA, A. M. et al. Aplicação do biopolímero de amido de cassava e amido de milho na conservação pós-colheita de guava. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 2, p. 6658-6680, 2020.

DIVAKARA, B. N. et al. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: a review. **Applied Energy**, v. 87, n. 3, p. 732-742, 2010.

DOS ESTADOS. et al. Agências de Vigilâncias Sanitárias. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. 2018. Disponível em: https://bit.ly/2SvOVbw. Acessado em: 05 de out. 2020.

EBERHARD, W. G. **Sexual selection by cryptic female choice in insects and arachnids**. In: Choe, J. C., Crespi, B. J. (Eds.) The evolution of mating systems in insects and arachnids, 32-57. Cambridge, Cambridge University Press, 1997.

EL-SAYED, A. M. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. Disponível em: <http://www.pherobase.com>. Acessado em: 10 de out. 2020.

ELLER, F. J. A. Previously unknown sexual character for the pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae). **The Florida Entomologist**, v. 78, n. 1, p. 180-183, 1995.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). BRS 399 nova cultivar de mandioca de mesa, de polpa amarela o Paraná e Mato Grosso do Sul. 2 pg. Embrapa-Cerrados, 2015.

FAOSTAT, FAO et al. FAO statistical databases. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2018. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. Acesso em: 05 de out. 2020.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Produzir mais com menos: Mandioca (2014). Disponível em: http://www.fao.org/ag/save-and-grow/cassava/pt/index.html. Acesso em: 02 de maio de 2020.

FEDDERWITZ, F. et al. Diel behaviour and time budget of the adult pine weevil *Hylobius abietis*. **Physiological Entomology**, v. 39, n. 2, p. 103-110, 2014.

FERREIRA, J. M. S. et al. Pragas do coqueiro. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 1997.

FERREIRA, J. T. B.; ZARBIN, P. H. G. Amor ao primeiro Odor a comunicação química entre os insetos. **Química Nova na Escola**, v. 7, n. 2, p. 101-104, 1998.

FIEDLER, C. Die Gattung *Eubulus* Kirsch (Col. Curcul. Cryptorhynch.). **Deutsche Entomologische Zeitschrift**, v. 1939, p. 37-125, 1939.

FIEDLER, C. Neue vertreter des genus *Eubulus* aus Süd-Amerika (Curculionidae). 60 Beitrag zur Kenntnis der Amerikanischen Cryptorhynchiden. **Rev. Chil. Entomol**. 2: 139–145, 1952.

FIEDLER, C. Neue *Eubulus*-arten aus Südamerika (Col. Cur. Cryptorhynch), pp. 202–209. In C. Fiedler (ed.), Neue Südamerikanische Rüsselkäfer aus der subfamilie Cryptorhynchini. **G. Fischer**, **Jena**, Germany, 1954a.

FIEDLER, C. Neue Beiträge zur Kenntnis der südamerikanischen arten der gattung *Eubulus* Kirsch, pp. 78–89. In C. Fiedler (ed.), Neue Südamerikanische Rüsselkäfer aus der subfamilie Cryptorhynchini. **G. Fischer, Jena**, Germany, 1954b.

FORNASARI, L.; SOBHIAN, R. Life history of *Eustenopus villosus* (Coleoptera: Curculionidae), a promising biological control agent for yellow starthistle. **Environmental entomology**, v. 22, n. 3, p. 684-692, 1993.

FUKUDA, W. M. G et al. Banco de germoplasma de mandioca: manejo, conservação e caracterização. **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Documentos (INFOTECA-E)**, 1996.

FUKUDA, W. M. G. M**elhoramento genético de mandioca**. EMBRAPA-CNPMF, 1995.

FREIRE, E. A. et al. IV **Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas**, João Pessoa, PB. Importância do Cultivo do Pinhão-Manso (*Jatrophas Curcas* L.) Para Uso Do Biodiesel, 2010.
GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. 2002. Piracicaba, FEALQ, 920p.

GARCIA, R. S. M.; DOS SANTOS, L. H. Controle integrado da broca da haste da mandioca *Sternocoelus* spp. In: **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: Congresso Brasileiro de Mandioca, 15., 2013, Salvador. Inovação e sustentabilidade: da raiz ao amido: trabalhos apresentados. Salvador: CBM: Embrapa, 2013. 1 CD-ROM., 2013.

GASSEN, D. N. et al. *Sternechus Subsignatus*, como praga da soja. **Emater**/RS-Ascar, 1987. Disponível em: http://hdl.handle.net/20.500.12287/52645. Acessado em: 10 de out. 2020.

GENBANK. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=652526>. Acessado em: 05 de nov. 2020.

GIBLIN-DAVIS, R. M. Borers of palms. **Insects on palms. Edited by FW Howard, Moore, D, Giblin-Davis RM, Abad, RG. CABI Publishing, Wallingford, GB**, p. 267-304, 2001.

GIBSON, L. P. Biology and life history of acorn-infesting weevils of the genus *Conotrachelus* (Coleoptera: Curculionidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 57, n. 5, p. 521-526, 1964.

GIBSON, L. P. Stridulatory mechanisms and sound production in *Conotrachelus* (Coleoptera: Curculionidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 60, n. 1, p. 43-54, 1967.

GIMP. ‘GNU’ Image Manipulation Program. Copyright (C) 2007 Free Software Foundation. Acessado em 12 de jan. 2020. Disponível em:< https://www.gimp.org/about/>

GOMES, J. C.; LEAL, E. C. Cultivo da mandioca para a região dos tabuleiros costeiros. **Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura**, 2003. Disponível em:https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_tabcosteiros/pragas.htm. Acesso em: 08 de out. 2020.

GUEDES, J. V. C.; PARRA, J. R. P. Oviposição dos curculionídeos-das-raízes dos citros (Coleoptera: Curculionidae). **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 673-678, 2004.

HALIK, S; BERGDAHL, D. R. Observations on the natural history, development, range, and future of *Eubulus parochus* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae). **The Coleopterists Bulletin**, v. 60, n. 4, p. 325-332, 2006.

HAN, W. et al. Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. **Chemosphere**, v. 192, p. 59-65, 2018.

HARRIS, J. W.E; COPPEL, H. C. The poplar-and-willow borer, *Sternochetus* (= *Cryptorhynchus*) *lapathi* (Coleoptera: Curculionidae), in British Columbia. **The Canadian Entomologist**, v. 99, n. 4, p. 411-418, 1967.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HELLER, J. Physic nut-*Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. **International Plant Genetic Resources Institute, Rome**, 1996. Disponível em: https://bit.ly/3d2itai. Acesso em: 06 de out. 2020.

HOFFMANN-CAMPO, C. B. et al. Aspectos biológicos e manejo integrado de *Sternechus subsignatus* na cultura da soja. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 1999.

HOFFMAN, G. D.; RAFFA, K. F. Maturation of the male pales weevil (Coleoptera: Curculionidae) reproductive system and its effect on male response to females. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 85, n. 5, p. 571-577, 1992.

HUNT, D. W. A. et al. Rearing method for *Hylobius radicis* and *H. pales* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of economic entomology**, v. 85, n. 5, p. 1873-1877, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. **Levant. Sistem. Prod. Agríc**., v. 24, n. 5, 2020. Disponível em:https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2020_mar.pdf. Acesso em: 06 de out. 2020.

JINBO, U. et al. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. **Entomological Science**, v. 14, n. 2, p. 107-124, 2011.

JOACHIM, C. et al. Modulation of aphid alarm pheromone emission of pea aphid prey by predators. **Journal of chemical ecology**, v. 39, n. 6, p. 773-782, 2013.

JOHNSON-CICALESE, J. M. et al. Biology, distribution, and taxonomy of billbug turf pests (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, v. 19, n. 4, p. 1037-1046, 1990.

KAMEL, D. A. et al. Smart utilization of jatropha (*Jatropha curcas* Linnaeus) seeds for biodiesel production: Optimization and mechanism. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 407-413, 2018.

KAMIYA, A. C. **Semioquímicos envolvidos no comportamento de acasalamento de** *Cyrtomon luridus* **Boheman (Coleoptera: Curculionidae) e na interação com a planta hospedeira Duboisia sp.(Solanaceae)**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

KARLSON, P.; LÜSCHER, M. Pheromone. **Naturwissenschaften**, v. 46, n. 2, p. 63-64, 1959.

LAROTONDA, F. D. S. et al. Desenvolvimento de biofilmes a partir da fécula de mandioca. 2002. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Disponível em: http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/82627. Acessado em: 12 out. 2020.

LEAL, W. S. Pheromone reception. In: **The chemistry of pheromones and other semiochemicals II**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 1-36. 2005.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Quantas espécies há no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 36-42, 2005.

LEATHERDALE, D. Cassava thesaurus. Cassava Information Center, Centro Internacional De Agricultura Tropical, p. 161 1977.

LOZANO, J. C. et al. **Field problems in cassava**. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1981.

LYAL, C. H. C. Weevil (Coleoptera: Curculionoidea) seed-predators of Syzygium and Eugenia spp.(Myrtaceae), with description of the *Alcidodes expansitarsis* species group (Coleoptera: Curculionidae: Molytinae: Mecysolobini). **Journal of Natural History**, v. 30, n. 11, p. 1683-1706, 1996.

LYAL C. H. C. Molytinae Schoenherr, 1823. In: **Handbook of Zoology, Arthropoda: Insecta**, **Morphology and Systematics**. Walter de Gruyter, p. 285-300, 2014.

MADDEN, M. J. L. et al. Using DNA barcoding to improve invasive pest identification at US ports-of-entry. **PloS one**, v. 14, n. 9, p. e0222291, 2019.

MANKIN, R. W. et al. Applications of acoustics in insect pest management. **CAB Rev**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2012.

MAPONDERA, T. S. et al. Identification and molecular phylogenetics of the cryptic species of the *Gonipterus scutellatus* complex (Coleoptera: Curculionidae: Gonipterini). **Australian Journal of Entomology**, v. 51, n. 3, p. 175-188, 2012.

MARTINS, C. B. da Cruz. Semioquímicos envolvidos nas interações intra e interespecíficas de *Oryzophagus oryzae* (Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae) e *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae). 2013. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Entomologia)) − Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Cutitiba, 2013. Disponível em: https://www.acervodigital.ufpr.br/handle/1884/29976. Acesso em: 10 de set. 2020.

MARTINS, C. B. C. et al. Cuticular compounds recognition and mating behavior of the rice water weevil *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of insect behavior**, v. 26, n. 6, p. 812-823, 2013.

MARVALDI, A. E.; LANTERI, A. A. Key to higher taxa of South American weevils based on adult characters (Coleoptera, Curculionoidea). **Rev. Chilena de História Natural**, v. 78, n. 1, p. 65-87, 2005.

MENDES, A. C. B. et al. BIOLOGIA DE *Conotrachelus humeropictus*, Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae), praga do cacau-eiro e do cupuaçuzeiro na Amazônia brasileira. **Acta Amazônica**, v. 27, n. 2, p. 135-143, 1997.

MESQUITA, A. L. M. Importância e métodos de controle do" moleque" ou broca-do-rizoma-da-bananeira. **Embrapa Agroindústria Tropical-Circular Técnica (INFOTECA-E) 17.** Fortaleza, Ceará. p. 5, 2003.

MIGUEL, E. S. et al. Avaliação do uso de agrotóxicos por agricultores familiares de uma comunidade rural de Viçosa-MG. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n.1, 2018.

MONTE, O. **Coleobrocas da mandioca. Biológico**, v. 6, p. 15-18, 1940.
MONTES, J. M.; MELCHINGER, A. E. Domestication and Breeding of Jatropha curcas L. **Trends in plant science**, v. 21, n. 12, p. 1045-1057, 2016.

MOREIRA, M. A. B.; ZARBIN, P. H. G.; CORACINI, M. D. A. Feromônios associados aos coleópteros-praga de produtos armazenados. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 472-477, 2005.

MUTIS, A. et al. Evidence of contact pheromone use in mating behavior of the raspberry weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, v. 38, n. 1, p. 192-197, 2009.

NASSAR, N. M. A.; ORTIZ, R. Cassava improvement: challenges and impacts. **The Journal of Agricultural Science**, v. 145, n. 2, p. 163, 2007.

NUNES, A. B. et al. Comportamento de estridulação em *Heilipus odoratus* Vanin & Gaiger (Coleoptera, Curculionidae, Molytinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 3, p. 334-336, 2009.

OLIVEIRA, C. M. et al. *Phyllophaga* sp. **(Coleoptera: Melolonthidae): uma nova praga de solo na cultura da mandioca no Brasil Central**. Revista Raízes e Amidos Tropicais, v. 3, n. 1, p. 496-499, 2007.

OLIVEIRA, C. M. et al. Principais pragas do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) no Cerrado Brasileiro. **Documentos**, 2011.

OLIVEIRA, C. M. et al. A Species of the Genus *Eubulus* (Coleoptera: Curculionidae): A New and More Destructive Cassava Pest in the Brazilian Cerrado. **Journal of Economic Entomology**, v. 112, n. 6, p. 3007-3011, 2019.

OLIVEIRA, C. M. et al. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, v. 56, p. 50-54, 2014.

OLIVEIRA, C. M. et al. Measuring population fluctuation of *jatropha* stem-borer [*Cophes notaticeps* (Marshall)] in the Brazilian Cerrado using a new trap. **Bulletin of entomological research**, v. 107, n. 5, p. 627, 2017.

OBERPRIELER, R. G. et al. Weevils, weevils, weevils everywhere. **Zootaxa**, v. 1668, n. 1, p. 491-520, 2007.

OBERPRIELER, R. G. et al. Curculionoidea Latreille, 1802: introduction, phylogeny. **Handbook of Zoology, Arthropoda: Insecta**, p. 285-300, 2014.

O'BRIEN, C. W; COUTURIER, G. Two new agricultural pest species of *Conotrachelus* (Coleoptera: Curculionidae: Molytinae) in South America. In: **Annales de la Société entomologique de France**. Paris: La Societe, p. 227-236. 1995.

PAGE, T. J. et al. The taxonomic feedback loop: symbiosis of morphology and molecules. **Biology Letters**, v. 1, n. 2, p. 139-142, 2005.

PERES, F. Saúde, trabalho e ambiente no meio rural brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, p. 1995-2004, 2009.

PÉREZ, P. CABEZUELO; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Dimorfismo sexual en pupas y adultos de *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleóptera: Curculionidae) plaga de la remolacha. **Boletín de sanidad vegetal. Plagas**, v. 7, n. 1, p. 207-210, 1981.

PESTANA, T. C.; CASTRO, G. H. F. Potencial da rama de mandioca para uso na alimentação de ruminantes: Revisão. Pub.Vet, v. 9, p. 429-466, 2015.

PIMENTEL, D.; PESHIN, R. Integrated pest management: pesticide problems. Springer Science & Business Media, vol. 3, p. 484. 2014.

PIMENTEL, D; BURGESS, M. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. In: **Integrated pest management**. Springer, Dordrecht, 2014. p. 47-71.

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

PINTO-ZEVALLOS, et al. Current knowledge and future research perspectives on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) chemical defenses: An agroecological view. **Phytochemistry**, v. 130, p. 10-21, 2016.

PRAÇA, L. B. *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae). **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos (INFOTECA-E)**, Brasília, DF. p. 23, 2007.

PRENA, J.; WHITEHEAD, D. R. A taxonomic revision of the Neotropical weevil genus *Cleogonus* Schönherr (Curculionidae, Molytinae). **Deutsche Entomologische Zeitschrift**, v. 59, n. 1, p. 55-79, 2012.

PROGRAMA DE ANALISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS (PARA). **Relatório complementar relativo à segunda etapa de amostras coletadas em 2012**. Gerência-Geral de Toxicologia. Brasília, out. 2014.

R Development Core Team (2019), R 1. 2. 13: a language and environment for statistical 584 computing. http://www.R-project.org.

RACETTE, G. et al. Activity of adult plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) on apple trees in spring. **Journal of economic entomology**, v. 84, n. 6, p. 1827-1832, 1991.

RAFAEL, J. A. et al. **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. 2012. Ribeirão Preto, Holos Editora, 810p.

RAMADAN, H. A.; BAESHEN, N. A. Biological Identifications through DNA barcodes. **Biodiversity conservation and Utilization in a Diverse World, InTech Publisher, Republika Hrvatska**, p. 109-129, 2012.

RATNASINGHAM, S; HEBERT, P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System (http://www. barcodinglife. org). **Molecular ecology notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.

REDDY, G.V. P; RAMAN, A. Visual cues are relevant in behavioral control measures for *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of economic entomology**, v. 104, n. 2, p. 436-442, 2011.

REDDY, G. V. P et al. Influence of trap type, size, color, and trapping location on capture of *Rhabdoscelus obscurus* (Coleoptera: Curculionidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, n. 3, p. 594-603, 2011.

RODRIGUEZ, M. A. D. et al. Armadilha CNPMF: nova técnica para o controle de brocas-da-haste da mandioca. **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2009.

ROSADO-NETO, G. H.; SANTOS, G. B. The elytro-tergal stridulatory apparatus of the genus *Bondarius* Rosado-Neto (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, n. 2, p. 337-338, 2010.

ROSADO-NETO, G. H.; MARQUES, M. I. Características do adulto, genitália e formas imaturas de *Gonipterus gibberus* Boisduval e *G. scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera, Curculionidae). **Rev. Bras. Zool.**, Curitiba, v. 13, n. 1, p. 77-90, 1996.

ROSKOV Y. et al. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2020-04-16 Beta. Disponível em:<www.catalogueoflife.org/col>. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858. 2020 Acessado em 09 de jun. 2020.

SANTOS, G. B.; ROSADO-NETO, G. H. Morphological aspects of the genitalia of seven species of *Heilus Kuschel* (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, n. 2, p. 157-164, 2010.

SARRO, F. B. et al. Aspectos da biologia e morfologia da broca do pedúnculo floral do coqueiro, *Homalinotus coriaceus* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 1, p. 7-12, 2004.

SATO, Y; KOHAMA, T. Post-copulatory mounting behavior of the West Indian sweet-potato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae). **Ethology**, v. 113, n. 2, p. 183-189, 2007.

SAUNDERS, D. S. et al. **Insect clocks**. Elsevier Science b.v, p, 577. 2002.

SAUNDERS, DAVID S. Circadian rhythms and the evolution of photoperiodic timing in insects. **Physiological Entomology**, v. 34, n. 4, p. 301-308, 2009.

SEYBOLD, S. J.; VANDERWEL, D. Biosynthesis and endocrine regulation of pheromone production in the Coleoptera. In: **Insect pheromone biochemistry and molecular biology**. Academic Press, p. 137-200. 2003.

SILVA-FILHO, G. et al. Dimorfismo sexual do gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae). **Neotrop. entomol**. Londrina, v. 36, n. 4, p. 520-524, 2007.

SILVA, I. P. Avaliação da entomofauna em frutos de espécies florestais do Cerrado. 2014. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) - Faculdade de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá. 2014. Disponível em: http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/handle/123456789/9532?show=full. Acessado em: 18 de out, 2020.

SILVA, M. T. B. Aspectos biológicos de *Sternechus subsignatus* em soja no sistema plantio direto. **Cienc. Rural, Santa Maria**, v. 29, n. 2, p. 189-193, 1999.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL (SINDIVEG). Brasil. Mercado total de Defensivos Agrícolas por Produto Aplicado, 2020. Acessado em 09 de jun. 2020. Disponível em:< https://sindiveg.org.br/estatistica/>

SOUZA, A. D. V. et al. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-manso, nabo-forrageiro e crambe. **Pesq. agropec. bras**., Brasília, v. 44, n. 10, p. 1328-1335, 2009.

SCHULZ-SCHAEFFER, J. **Cytogenetics, plants, animals, humans**. Springer-Verlag New York Inc. p, 452. 1980.

SHARMA, S.; DHAMIJA, H. K.; PARASHAR, B. *Jatropha curcas*: a review. **Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 3, p. 107-11, 2012.

SMITH, St. G. The Cyto-taxonomy of Coleoptera 1, 2. **The Canadian Entomologist**, v. 82, n. 3, p. 58-68, 1950.

STORK, N. E. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth?. **Annual review of entomology**, v. 63, p. 31-45, 2017.

SZCZERBOWSKI, D. et al. (1R, 6R)-2, 2, 6-Trimethyl-3-oxabicyclo [4.2. 0] octan-4-one, a new monoterpene lactone produced by males of the cocoa borer *Conotrachelus humeropictus* (Col.: Curculionidae). **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 26, p. 2842-2844, 2016.

TILLMAN, J. A. et al. Insect pheromones—an overview of biosynthesis and endocrine regulation. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 29, n. 6, p. 481-514, 1999.

THOMAZINI, M. J. A broca dos frutos do cupuaçuzeiro, *Conotrachelus hueropictus* FIEDLER. **Embrapa Acre-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2000.

THOMPSON, R. T. Observations on the morphology and classification of weevils (Coleoptera, Curculionoidea) with a key to major groups. **Journal of natural History**, v. 26, n. 4, p. 835-891, 1992.

UZAKAH, R. P.; ODEBIYI, J. A. The mating behaviour of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). **Scientific Research and Essays**, v. 10, n. 10, p. 348-355, 2015.

UZAKAH, R. P. Age at sexual maturity of male and female banana weevils, *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). **Acta Zoologica**, v. 99, n. 1, p. 2-8, 2018.

UZAKAH, R. P.; UZAKAH P. Activity rhythm of the banana weevil, Cosmopolites sordidus Germar (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Experimental Agriculture International**, p. 1-8, 2018.

VANIN, S. A.; GAIGER, F. A new spermophagous species of *Heilipus* Germar from the Amazonian region (Coleoptera, Curculionidae, Molytinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 49, n. 2, p. 240-244, 2005.

VANIN, S. A.; BENÁ D. C. A new species of *Heilipus* Germar (Coleoptera: Curculionidae: Molytinae) associated with commercial species of Annonaceae in Brazil, and comments on other species of the genus causing damage to avocado trees in Brazil. **Zootaxa**, v. 3905, n. 4, p. 541-556, 2015.

VAURIE, P. A new species of *Hyphantus*, a synonym, and various notes (Coleoptera: Curculionidae: Otiorhynchinae). **The Coleopterists' Bulletin**, p. 37-41, 1964.

VENDRAMIM, J. D. et al. Comportamento de oviposição da mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) biótipo B em tomateiro. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 1, p. 126-132, 2009.

VIDAL, D. M. et al. Isophorone derivatives as a new structural motif of aggregation pheromones in Curculionidae. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

VIDAL S. Contribución a la aclaración definitiva del problema existente entre las especies "*Gonipterus gibberus*" Boisd. y "*G. platensis*" Mar.Notas Mus. La Plata (Zoologia) 18 (157): 31-41. 1955.

VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. Feromônios de insetos. **Viçosa, Impr. Univ., 155p**, 1987.

VILELA, E. F. Adoção de feromônios no manejo integrado de pragas. **Pesquisa**

Agropecuária Brasileira, v. 27, n. 23, p. 313-318, 1992.

VILELA E.; DELLA LUCIA T. **Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação**. 2 ed. Ribeirão Preto: Holos. 206 p. 2001.

WALGENBACH, C. A.; BURKHOLDER, W. E. Mating behavior of the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 80, n. 5, p. 578-583, 1987.

WIBMER, G. J.; O'BRIEN, C. W. Annotated checklist of the weevils (Curculionidae sensu lato) of South America (Coleoptera: Curculionidea). **Memoirs of the American Entomological Institute**, n. 39, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) & FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) Disponível em: https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food. Acesso em 05 de out. 2020.

WYATT, T. D. **Pheromones and animal behavior: chemical signals and signatures**. Cambridge University Press, p. 424. 2014.

YAMAMOTO, M. E et al 2002. Vocabulário inglês/português de termos da área de etologia. **Revista de Etologia**, 4, 2: 75-94, 2002.

ZARBIN, P. H. G. et al. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identifição estrutural de feromonios de insetos. **Quimica Nova**, v. 22, n. 2, p. 263–268, 1999.

ZARBIN, P. H.G. et al. Male-specific volatiles released by the brazilian papaya weevil, *Pseudopiazurus obesus*: partial identification and evidence of an aggregation pheromone. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 1048-1053, 2007.

ZARBIN, P. H. G. et al. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 722-731, 2009.

ZARBIN, P. H. G. et al. Synthesis of Pheromones: Highlights from 2002-2004. **Current Organic Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 299-338, 2009.

CAPÍTULO 2: Identificação dos compostos candidatos a feromônios de *Mormidea v-luteum* (Lichtenstein, 1796) e a investigação da bioatividade e dinâmica de produção de compostos sexo-específicos de *Arvelius albopunctatus* (De Geer 1773) e a (Heteroptera: Pentatomidae)

RESUMO

Mormidea v-luteum (Lichtenstein, 1796) e *Arvelius albopunctatus* (De Geer, 1773) são tidas como espécies de insetos-praga para o cultivo do arroz e tomate, respectivamente. Devido seu hábito de alimentar sugador, os seus danos ocasionam perda de produtividade e possível transmissão de patógenos às plantas cultivadas. Com o objetivo de desenvolver uma técnica de monitoramento ecologicamente correta, foram investigados os compostos envolvidos na comunicação química dessas espécies. As coletas dos odores sexo-específicos ocorrem via sistema de areação pelo período de 24 horas (amostra/sexo) separados por câmaras de vidro. As análises ocorreram via Cromatografia em fase Gasosa e acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), e por meio de Cromatografia em fase Gasosa acoplada à espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (CG-ITFR). Para adultos virgens de *M. v-luteum* detectaram-se a presença de seis compostos macho-específicos como sendo isômeros do zingiberenol (**1** e **2**), isômeros do murgantiol (**3**, **5** e **6**), e sesquipiperitol (**4**). Os compostos **1** e **5** foram majoritários, os quais foram produzidos na razão de 6:4, e que juntos corresponderam a 78% da produção total dos compostos macho-específicos emitida. A estereoquímica absoluta dos isômeros do zingiberenol foi estabelecida por derivatizações do extrato e análises de cromatografia em fase estacionária quiral. O composto **1** foi definido como (1S,4R,1'S)-zingiberenol, enquanto o composto 2 foi (1*R*,4*R*,1'*S*)-zingiberneol. Contudo, as estereoquímicas não foram determinadas para todas as moléculas de *M. v-luteum*. Para adultos virgens de *A. albopunctatus* foram detectados nos extratos naturais a presença de dois compostos macho-específicos, o minoritário **1** e o majoritário **2** na proporção de 4,9: 95,1 respectivamente. A produção dos dois compostos macho-específicos coletados ocorreu significativamente no período da escotofase. Para confirmar a atratividade dos compostos naturais macho-específicos evidenciados, foram utilizados os bioensaios em olfatometria em 'Y', que para *Mormidea v-luteum* realizou-se testes

empregando o extrato bruto e compostos sintéticos, enquanto para *A. albopunctatus,* os extratos brutos naturais. Os voláteis machos-específicos naturais de *M. v-luteum* apresentou-se como um feromônio de agregação. Nos bioensaios com os compostos sintéticos, (1'*S*)-zingiberenol foi altamente atrativo para ambos os sexos. Contudo, quando (1'*S*)-murgantiol foi testado, somente as fêmeas foram atraídas. Interessantemente a mistura do zingiberenol e murgantiol versus controle, ambos os sexos foram atraídos, enquanto a mistura versus zingiberenol, somente fêmeas foram atraídas para a mistura. Para adultos virgens de *Arvelinus albopunctatus*, o extrato natural com os compostos macho-específicos demostraram através de bioensaios uma atratividade significativa de fêmeas versus controle, enquanto machos não diferiram estatisticamente. Assim, os bioensaios com *M. v-luteum* sugerem que as moléculas determinadas têm diferentes funções na comunicação desta espécie; sendo que o zingiberenol atua primariamente como um feromônio de agregação, enquanto o murgantiol desempenha um papel de feromônio sexual. Para *A. albopunctatus*, os compostos macho-específicos desempenharam um papel de feromônio sexual, e até o momento, a identificação para *A. albopunctatus* segue em andamento pelo laboratório de Semioquímicos da UFPR.

Palavras-chave: Agregação. Comportamento. Feromônios. Murgantiol. Zingiberenol.

ABSTRACT

Mormidea v-luteum (Lichtenstein, 1796) and *Arvelius albopunctatus* (De Geer, 1773) are reported feeding on commercial crops, such as rice and tomato, causing damage that slows growth and reduces productivity. With the aim of developing an eco-friendly control technique, we investigated the compounds involved in chemical communication of these species. The sex-specific volatiles were collected via aeration system during 24 hours per sample/sex sort by glass chambers. The analyses occurred by gas chromatograph/mass spectrometry and gas chromatography/Fourier transform infrared spectroscopy. The extracts of virgin adults of *M. v-luteum* showed six male-specific compounds, identified as two isomers of zingiberenol (compounds 1 and 2), three isomers of murgantiol (3, 5 and 6) and sesquipiperitol (4). Compounds 1 and 5 were the major components and were produced in a ratio of 6:4, which corresponds to 78% of the total amount emitted. The absolute stereochemistry of the two isomers of zingiberenol was established as (1*S*,4*R*,1'*S*)-1 and (1*R*,4*R*,1'*S*)-2 by chiral gas chromatography. Stereochemistry were not determined for all the other molecules of *M. v-luteum*. To the natural extracts of *A. albopunctatus* showed two male-specific compounds (**1**- **2**), a minor (**1**) and a major (**2**) in ratio of 4.9: 95.1, respectively. The male-specific extracts were major significantly produced during the scotophase. To confirm the attractiveness of these chemicals, bioassays were performed in a Y-tube olfactometer, which were tests crude extracts and, subsequently, synthetic compounds to the *M. v-luteum*, and crude extracts to the *A. albopunctatus*. In *M. v-luteum*, the male volatiles were attractive to both sexes, demonstrating an aggregation pheromone. In bioassays with synthetic compounds, (1'*S*)-zingiberenol was highly attractive to both males and females. However, when (1'*S*)-murgantiol was tested, only females were attracted. Interestingly, when a mixture of zingiberenol and murgantiol isomers was tested, it was attractive to both sexes, with females more attracted to the mixture than to zingiberenol alone; males did not distinguish between treatments. Virgin females of *A*. *albopunctatus* showed significantly attractiveness to the male-specific compounds against to the control, while males did not differ between the treatment or control. Thus, the bioassay data suggest that the molecules have different functions in chemical communication of this species: zingiberenol acts primarily as an aggregation pheromone, while murgantiol plays a role as a sex-pheromone. In *A*.

albopunctatus, the male-specific compounds play as sex-pheromone. However, the identification of the compounds emitted by *A*. *albopunctatus* is under way by the Laboratório de Semioquímicos da UFPR.

Keywords: Aggregation. Behaviour. Murgantiol. Pheromone. Zingiberenol.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do arroz (*Oryza sativa* L.) e do tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) são de abrangência mundial, na qual a produção tem sido liderada pelo continente asiático, o responsável por 90,7% da produção de arroz e 53,8% pela produção de tomate no mundo; o Brasil aloca-se em nono lugar de produção para ambas as culturas (FAO, 2018). A produção brasileira para a safra de arroz de 2018-2019 apontou um total de 11 milhões de toneladas com destaque para região centro-sul, responsável por mais de 70% da produção brasileira (CONAB, 2020). Sobre o cultivo do tomate, a produção nacional de 2019 foi de um total de 4 milhões de toneladas, dos quais cerca de 45% origina-se da região sudeste (IBGE, 2020).

Independentemente da área de produção, nacional ou internacional, fatores edafoclimáticos e a ocorrência de espécies pragas podem ocasionar uma oscilação de produtividade dos cultivos agrícolas. Por exemplo, espécies de percevejos tidos como insetos-praga, que para ambas as culturas mencionadas têm sido reportados espécies ocasionando diferentes tipos de danos, variando entre a parte aérea, raiz e durante o estágio vegetativo ou de maturação dos cultivos (GALLO et al., 2002; PANIZZI; LUCINI, 2017). Certas espécies de insetos-praga possuem uma relação muito próxima com as espécies de plantas pelo homem cultivado, seja pela ampla produção, o que se retrata pela grande disponibilidade de alimento ou ainda uma relação evolutiva; o que com essas relações podem surgir as espécies de importância agrícola e gerarem sérias perdas econômicas (POSSEBOM et al., 2020).

No cultivo do arroz reportam-se diferentes espécies com diferentes hábitos de vida. Assim, na parte aérea, percevejos pentatomídeos fitófagos alimentam-se internamente da planta ao sugar os nutrientes via o aparelho bucal do tipo sugador, como por exemplo, os percevejos das espécies *Mormidea v-luteum* (Lichtenstein, 1796) e *Oebalus poecilus* (Dallas 1851), os quais indicam gerar danos percentuais na fase de maturação da cultura do arroz de até 80% (FERREIRA; BARRIGOSSI, 2006; GRAZIA et al., 2015). No cultivo de tomate também ocorrem diferentes espécies-pragas com diferentes hábitos alimentares, por exemplo, a mosca-branca, *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae), *Arvelius albopunctatus* (De Geer, 1773) (Hemiptera: Pentatomidae) sugam o nutriente da planta hospedeira com o aparelho bucal do tipo sugador, e a lagarta-do-tomateiro

Tuta absoluta (Meyrick, 1917) (Lepidoptera, Gelechiidae) possui o aparelho bucal mastigador, alimentando-se das folhas do tomate (GARBELOTTO; CAMPOS, 2014; PRATISSOLI; DE CARVALHO, 2015).

Salienta-se que a perda de produtividade, indiferente do cultivo, pode variar de acordo com intensidade do ataque e os danos ocasionados, os quais podem ser de modo direto ou indireto; no modo direto via alimentação na planta hospedeira e indiretamente via transferência de possíveis patógenos nocivos, e assim reduzir o vigor e, consequentemente, o potencial de produção (PANIZZI; LUCINI, 2017). Assim, manter a saúde de plantas de interesse econômico e alavancar a produção tem sido um desafio hercúleo ao longo dos anos, e nesse enfretamento destaca-se o importante suporte do Manejo Integrado de Pragas nas últimas décadas, que preconiza de forma intelectual reduzir o dano ocasionado por espécies-praga, ao fundamentar o conhecimento da espécie alvo (taxonomia), amostragem para nível de dano e a implementação de técnicas de controle como o uso de feromônios, o controle biológico e o entendimento do ambiente (GALLO, 2002; DENT; BINKS, 2020).

As técnicas e fundamentos do MIP surgiram devido ao uso irracional do método convencional de controle de pragas, via aplicação de agrotóxicos (VILELA, 1992; GALLO et al., 2002). Os principais agravantes estão listados pelo desenvolvimento de espécies resistentes às moléculas de inseticidas, contaminação ambiental, contaminação ocupacional, a mortandade de insetos benéficos à agricultura, como as abelhas, e também na persistência de moléculas de inseticidas em produtos da alimentação humana (STOPPELLI; MAGALHÃES; 2005). Com isso levantam-se sérios problemas de calamidades de forma aguda e crônica na área ambiental, e da saúde pública do Brasil e do mundo (GRÜTZMACHER et al., 2008). Ao visar uma melhor qualidade de vida na esfera ambiental e da saúde humana, a implementação de pesquisas com feromônios se destaca (VILELA, 1992; ZARBIN et al., 2009). A versatilidade da técnica propicia a realização do monitoramento, da amostragem, da confusão sexual e do controle populacional de espécies-praga, bem como alavanca conhecimentos para esclarecer as diversas relações intraespecíficas ecológicas que os organismos realizam através de pistas odoríferas (VILELA; DELLA LUCIA, 1987; VILELA; DELLA LUCIA, 2001; BERGSTROM, 2007). Os feromônios são compostos relacionados entre indivíduos de uma mesma espécie, no qual a comunicação pode ser realizada via um sinal químico natural de curto ou longo alcance e estarem

relacionado com os comportamentos de agregação e/ou sexual (FERREIRA; ZARBIN, 1998; ZARBIN et al., 2009; MARTINS et al., 2013). Entender e decifrar as mensagens odoríferas que espécies-praga utilizam para se comunicar em campo, torna-se uma técnica racional de monitoramento/controle (VILELA, 1992; WITZGALL et al., 2010).

Assim, devido sua especificidade, o uso de feromônio contribui para reduzir o uso de inseticida, direciona esforços para preservação e conservação ambiental, principalmente de espécies essenciais e benéficas ao meio ambiente e a produtividade na agricultura, visto que são moléculas utilizadas na comunicação, exclusivamente, entre macho e fêmea de uma espécie (MCNEIL, 1991; WITZGALL et al., 2010). Nesta linha de pesquisa até então, nada havia sido estudado para entender a comunicação, o diálogo a nível intraespecífico das espécies de percevejo *Mormidea v-luteum,* o percevejo-do-arroz e de *Arvelius albopunctatus*, o percevejo-do-tomate.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O CULTIVO DE ARROZ E TOMATE E AS SUAS PRINCIPAIS ESPÉCIES-PRAGAS DE PERCEVEJOS PENTATOMÍDEOS

Pertencente à família Poaceae, o gênero *Oryza* contempla mais de vinte espécies, sendo de hábito aquático a semiaquático como é o caso de *Oryza sativa* L. a mais cultivada (CHANG, 1985). O histórico do cultivo do arroz tem um aspecto milenar e sua domesticação iniciou-se no continente asiático, contudo hoje se expandiu globalmente (SHARMA, 2010). A produção mundial é liderada pelo continente asiático, e a China perfaz por volta de 212 milhões de toneladas, enquanto nas Américas a produção corresponde em torno de 33,83 milhões de toneladas das quais 11,3 são oriundas dos cultivos brasileiros (FAO, 2018). No Brasil, o cultivo tem sido realizado em praticamente todos estados, no qual o maior produtor tem sido o Rio Grande do Sul ao corresponder por cerca de 60% da produtividade nacional (OLIVEIRA NETO, 2015; CONAB, 2020).

As principais fases da orizicultura são as fases vegetativa, reprodutiva e de maturação, e as condições hidro e edafo-fisiomórficas das áreas plantadas podem influenciar o manejo da cultura (PEDROTTI et al., 2001; RODRIGUES et al., 2004).

Além disso, em ambas as fases de desenvolvimento, o cultivo torna-se alvo de espécie de insetos-praga, como as espécies percevejos fitófagos (BOTTA et al., 2014; HICKEL et al., 2016).

Para região neotropical, reporta-se variadas espécies de percevejos fitófagos da família Pentatomidae, espécies como *Nezara viridula* (L. 1758), *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851), *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837), *Euschistus heros* (Fabricius 1794), *Tibraca limbativentris* Stal, 1860, *Oebalus ypsilongriseus* (De Geer, 1773), *Oebalus poecilus* (Dallas, 1851) e *Mormidea v-luteum* (Lichtenstein, 1796) (GRAZIA et al. 1999; PANIZZI; GRAZIA 2015; SCHAEFER; PANIZZI 2000). Pertencentes a tribo carpocorini, as últimas cinco espécies citadas são descritas relacionadas com plantas da família Poaceae e associadas a espécies de plantas de interesse agrícola como é o caso do cultivo do arroz (*Oryza sativa*) (COKL; BORGES, 2017; LOPES et al., 1974; SCHAEFER; PANIZZI, 2000). Em especial, *M. v-luteum* também tem sido reportado para os cultivos da soja, milho, trigo, azevém e até para o tomate (*Lycopersicum esculentum*) (Solanaceae) (GARBELOTTO; CAMPOS, 2014). Assim, observa-se que *Mormidea v-luteum* possuí um habito polífago.

Para a Família Solanaceae, a qual remonta a sua origem pela América Central e Sul, compreendem um grupo de plantas de grande importância econômica a nível global, que incluem os cultivos como batata, tomate e berinjela (GUN; GAFFNEY, 1971; JAGATHEESWARI, 2014). Dados da produção de tomate em 2018 somam-se acima de 182 milhões toneladas, sendo 61,3% oriundo da Ásia e 14,3% das Américas (FAO, 2018). Nas Américas, a produção brasileira em 2020 foi cerca de 4 milhões de toneladas, a terceira maior do continente e destacando-se os estados de São Paulo e Goiás com uma produtividade de 1 milhão de toneladas cada (IBGE, 2020; CONAB, 2019).

Assim como observado para a cultura do arroz e tomate, as espécies de insetos-pragas são os principais entraves que afetam a produtividade e aumentam o custo de produção (SCHAEFER; PANIZZI, 2000; GALLO et al., 2002). Para o cultivo do tomate são reportadas várias espécies de pentatomídeos, tais como *Halyomorpha halys* (Stal, 1855), *Nezara viridula, Edessa rufomarginata* (De Geer, 1773), *Mormidea v-luteum e Arvelius albopunctatus* (LYE, et al., 1988; GARBELOTTO; CAMPOS, 2014; PEIFFER; FELTON, 2014; GORDON et al., 2017), sendo os dois últimos, espécies chave desta pesquisa que visa um melhor entendimento e propor

perspectivas de controle e/ou monitoramento em campo com base no Manejo Integrado de Pragas (MIP) e com pesquisas sobre feromônios.

Além dos pentatomídeos fitófagos apresentarem o hábito alimentar polífago, possuem um intricado comportamento, dispersão, bem como uma morfologia variada (SILVA et al., 2004; GARBELOTTO; CAMPOS, 2014; PANIZZI, 2015). *A. albopunctatus,* o percevejo-do-tomate, ainda é tido como uma espécie de grande potencial invasivo (PANIZZI, 2015; MCPHERSON, 2017).

2.2 HETEROPTERA: PENTATOMIDAE

A classe Insecta abriga variadas ordens de insetos, e a Ordem Hemiptera Linnaeus (1758) comporta uma ampla diversidade, por volta de 104 mil espécies para mundo, e que variam entre 0,5 a 130 milímetros de comprimento (GRIMALDI; ENGEL, 2005; SZWEDO, 2018). A ordem acomoda três subordens, Sternorrhyncha, os chamados de pulgões e cochonilhas, Auchenorrhyncha, os descritos como cigarras e cigarrinhas e Heteroptera, os popularmente chamados de percevejos; ademais, as Ordens desses insetos apresentam desenvolvimento hemimetábolo (ovo, ninfa e adulto) (GRIMALDI; ENGEL, 2005; RAFAEL; MARQUES, 2017).

Além disso, o aparelho bucal picador-sugador encontrado na subordem Heteroptera (do grego *hetero*= diferente e *pteron*= asa) dos percevejos verdadeiros e no caso os fitófagos, podem transmitir doenças a planta hospedeira durante a fase de alimentação bem como reduzir o seu vigor, ou seja, seu potencial de produção (SCHAEFER; PANIZZI, 2000; MEDRANO et al., 2007; GRAZIA; FERNANDES, 2012). Por outro lado, há outras espécies de percevejos que se alimentam de outros insetos, conhecidos como percevejos predadores, que contribuem para o controle biológico como é o caso das espécies de *Podisus maculiventris* (Say,1824), *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) e *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Heteroptera: Anthocoridae) (FUNDERBURK et al., 2000; DE CLERCQ et al., 2002; FERREIRA et al., 2008).

Assim, a biodiversidade conhecida dentro de Heteroptera permeia por volta de 40 mil espécies, que para os percevejos fitófagos de grande importância agrícola alocados na família Pentatomidae são conhecidos em torno de 4,7 mil espécies distribuídas pelo mundo (PANIZZI; GRAZIA et al., 2015). Somente para Pentatomidae, foram relatadas mais de 40 espécies de importância econômica

(SCHAEFER; PANIZZI, 2000). Para a região neotropical são registrados por volta de 1,4 mil espécies das quais se concentram dentro de Pentatominae, uma subfamília de hábito de vida fitófago e polífago (GARBELOTTO; CAMPOS, 2014; PANIZZI; GRAZIA et al., 2015). Atualmente, são reconhecidas sete subfamílias para Pentatomidae com cerca de 2,8 mil espécies descritas e distribuídas entre espécies fitófagas e predadoras, sendo os fitófagos os mais numerosos (GRAZIA et al., 2015). Somente para o Brasil, Pentatomidae registra aproximadamente 650 espécies (GRAZIA; FERNANDES, 2012; GRAZIA et al., 2015). Para o gênero *Mormidea* foram descritas de 33 espécies (ROLSTON, 1978).

2.3 BIOLOGIA, COMPORTAMENTO E COMUNICAÇÃO EM PENTATOMIDAE

2.3.1 Biologia

Em Pentatomidae, o desenvolvimento hemimetábolo ocorre com cincos estágios de ninfas, e apresentando espécies univoltinas e multivoltinas (RICE et al., 2014; KOCH et al., 2017) sendo majoritariamente espécies ovíparas e de hábito terrestre (GRAZIA; FERNANDES, 2012). As posturas são realizadas nas regiões da parte área da planta hospedeira, e em especial na região foliar, no qual os ovos agrupados possuem o formato abaulado (GRAZIA et al., 2015a).

Entre espécies de pentatomídeos relacionadas, observa-se para espécies do gênero *Chinavia* Orian 1965 dados de biologia de ovo ao adulto similar, por volta de 39 a 45 dias (MATESCO et al., 2009; SILVA et al., 2015). Para o grupo, a tribo Carpocorini, a qual a espécie *Mormidea v-luteum*, fêmeas podem realizar posturas por volta de 80 ovos e atingirem uma idade de 38,6 dias de vida/adulto (COSTA et al., 1998). Em *Oebalus* spp. evidenciou-se o ciclo de vida da fase hibernante de 28,1 dias e não hibernante 35,7 dias (VECCHIO et al., 1994; GREVE et al., 2003). O gênero *Oebalus* é tido como grupo irmão de *Mormidea* sp. (ROLSTON, 1978), o que de certo modo pode fornecer dados de hábito de vida importante para entendimento a nível intra e interespecífico. Uma vez que o estudo aprofundado do grupo *Mormidea* sp. ainda é bem reduzido, e das espécies conhecida, somente duas tem sua biologia documentada. Para *Mormidea pictiventris* Stål, 1862 em laboratório apresentou uma postura de até 32 ovos/fêmeas e uma taxa de eclosão de 94,6% com ciclo de vida de 26,1 dias (ovo-adulto) (BRANDÂO et al., 2018) e para

Mormidea notulifera Stal, 1960 o formato dos ovos são o encontrada para o grupo, em forma abaulada de barril, dispostos em fileira na próxima do amarelo; em paralelo a biologia do gênero apresenta uma aspecto semelhante em tempo desenvolmento (COSTA-LIMA, 1940; DA SILVA et al., 1990).

Em *Arvelius albopunctatus*, Campos e colaboradores (2007) evidenciaram a morfologia de imaturos do primeiro ao quinto instar diferenças na sua coloração, ao variar entre verde e vermelho; Sobre a biologia da espécie, reportaram-se fêmeas com uma postura média de 28,2 ovos posto de forma agrupada e de formato arredondado; o estágio total de desenvolvimento até adulto por volta de 62 dias (MARTÍNEZ; FOLCIA, 1999). Observa-se também semelhante desenvolvimento para *Halyomorpha halys* (Pentatomidae: Cappaeini), o percevejo mármore, uma espécie praga de cultivos, os resultados apontaram um média de postura de 28 ovos/fêmeas, e um período de desenvolvimento de aproximadamente de 37 a 121 dias para diferentes condições laboratoriais de temperatura de ovo ao adulto (NIELSEN et al., 2008).

De um modo geral, o ciclo de vida de uma espécie, fatores exógenos (Ex. extremos ambientais) e endógenos (Ex. fisiológico e químico) podem influenciar o período reprodutivo e o desenvolvimento da prole, seja entre os mais diferentes estágios de vida, ovo, ninfa e adulto (SAULICH; MUSOLIN, 2004; CHOWN; TERBLANCHE, 2006; GULLAN; CRASTON, 2012). Por fim, dentro da história de vida do grupo, vários fatores têm sido apontados e estes estariam influenciando o desenvolvimento dessas espécies, como por exemplo, as mudanças climáticas e a qualidade nutricional da fonte de alimento (PANIZZI et al., 1989; GRAZIA et al., 2015a; KISTNER, 2017). Ademais, os hábitos de vida dessas espécies podem hospedar e transferir patógenos para a planta hospedeira, qual se reporta para *A. albopunctatus* como potencial vetor do parasito protozoário *Phytomonas* sp. para o cultivo de tomate (KASTELEIN; CAMARGO,1990).

2.3.2 Comportamento e comunicação

Os pentatomídeos desempenham um intricado comportamento de cópula, o qual tem sido evidenciado pela emissão de compostos químicos, os feromônios, de alarme, sexual e de agregação (BRÉZOT et al., 1994; ZARBIN et al., 2000; FÁVARO et al., 2011; ZARBIN et al., 2012; KAVČIČ et al., 2013). Além de sinais químicos

intraespecíficos, esses insetos são capazes de produzir sinais vibracionais, dos quais têm sido documentados para várias espécies dentro do grupo (ver. COKL et al., 2005; ŽUNIČ et al., 2008; POLAJNAR et al., 2013; KAVČIČ et al., 2013). Evidenciou-se que estes sinais podem diferir entre as frequências produzidas e entre os substratos que são emitidos, o que poderia atuar como mecanismo de isolamento reprodutivo (POLAJNAR et al., 2013; KAVČIČ et al., 2013; LAUMANN et al., 2016).

De um modo geral, o comportamento e a comunicação desencadeada via a produção sonora tem sido documentada para uma variada gama de espécies de insetos (FINN et al., 1972; DESUTTER-GRANDCOLAS, 1997; ROSADO-NETO; SANTOS, 2010; WANG et al., 2012; KAVČIČ et al., 2013). Observa-se a presença do órgão de Johnston e de mecanorreceptores, os quais são responsáveis pelo reconhecimento vibracional (ČOKL,1983; JERAM; ČOKL, 1996). Assim, de um modo geral, o reconhecimento e a caraterização destes sinais sejam químicos e/ou sonoros, ambos são importantes ferramentas no controle/monitoramento de espécies-pragas, visto que podem reduzir o uso de inseticidas (ZARBIN et al., 2009; TAKANASHI et al., 2019).

Em paralelo, o comportamento de alimentação pode ser uma importante ferramenta no entendimento de uma potencial espécie-praga. Por exemplo, *Oebalus poecilus*, *Tibraca limbativentris,* e principalmente *Mormidea v-luteum* são reportados para os cultivos de arroz no Brasil; além do mais *O*. *poecilus* e *M*. *v-luteum* foram documentados alimentando-se da parte aérea, na formação dos grãos de arroz, enquanto *T*. *limbativentris* tem sido reportado atacando a região do caule (colmo) (FERREIRA; DA SILVA MARTINS, 1984; FERREIRA et al., 2001). Com diferentes áreas para atacar, os danos causados por percevejos fitófagos reduzem o vigor e a potencialidade produtiva de um cultivo (ROZA-GOMES et al., 2011). Além disso, conhecendo a preferencia e hábito alimentar de uma espécie-praga alvo, possibilita intervi estrategicamente com um plano de monitoramento/controle (COSTA, 2014).

2.4 FEROMÔNIOS DE INSETOS: PENTATOMIDAE

2.4.1 Pesquisas com feromônios: Pentatomidae (Pentatominae)

Assim como evidenciado no primeiro capítulo, o uso de feromônio na agricultura tem ao longo do seu descobrimento e entendimento uma aplicação no

Manejo Integrado de Pragas, na compreensão ecológica e comportamental dos insetos (ZARBIN et al., 2009). Os feromônios são compostos emitidos por uma espécie, e que podem desencadear uma resposta comportamental no sexo oposto (KARLSON; LÜSCHER, 1959). As detecções dos compostos ocorrem especialmente pelas sensilas localizadas nas antenas destes animais (LEAL, 2005). Estes compostos são atrelados a um nível intraespecífico, ou seja, entre indivíduos da mesma espécie, os compostos feromonais geralmente podem ser de agregação, sexual e ou alarme (ZARBIN et al., 2009).

Entre os pentatomídeos, os semioquímicos (= sinais químicos), compostos interespecíficos (feromônios) e intraespecíficos (aleloquímicos) estudados foram trabalhados dentro de 57 gêneros para 99 espécies, e que majoritariamente estão representados pela subfamília Pentatominae com 38 gêneros estudados (EL-SAYED, 2020). No aspecto histórico, o primeiro feromônio identificado em Pentatomidae foi realizado em 1960 para *Oebalus pugnax* (Fabricius, 1775) a partir de compostos da glândula de cheiro, apontado com um composto de defesa (BLUM et al., 1960). Subsequente, Aldrich e colaboradores em 1978 evidenciaram o primeiro feromônio caracterizado como sexual para família, oriundo das glândulas dorso-abdominais de adultos de *Podisus maculiventris*.

Dos compostos identificados como sexual e agregação, estes possuem diferenças nas suas estruturas químicas ao variarem entre compostos cíclicos e acíclicos, na presença de isômeros de natureza geométrica e espacial, e ainda serem comumente produzidos e emitidos por machos das espécies (ZARBIN et al., 2007; BERGMANN et al., 2009; EL-SAYED, 2020). A seguir em ordem alfabética apresentam-se os trabalhos com ênfase sobre a biodiversidade de espécies conhecidas para as tribos de Pentatominae, bem como sobre os estudos com feromônios para as tribos e espécies estudadas até o momento.

Antestiini

Dentro das espécies estudadas, estas estão alocadas em três gêneros: *Antestiopsis* Leston, 1783 com vinte espécies, *Plautia* Stål, 1865 com 26 espécies e *Thyanta* Stål, 1862 com 34 espécies descritas para mundo, das quais vinte ocorrem na América do Sul (RIDER; CHAPIN, 1991; RIDER; CHAPIN, 1992; RIDER, 2020).

Na a base de dados sobre feromônio (*Pherobase*), são registrados três gêneros e no total foram seis espécies estudadas para a tribo: *Antestiopsis thunbergii* (Gmelin 1790) versou-se sobre compostos coletados de ninfas; enquanto para *Thyanta* Stål foram estudados os compostos feromonais de adultos sendo quatro espécies investigadas, e três evidenciaram a presença de compostos caracterizados como feromônios sexuais para *Thyanta perditor* (Fabricius, 1794), *Thyanta custator accerra* McAtee, 1919 e *Thyanta pallidovirens* (Stål, 1859) (ver. EL-SAYED, 2020). *Plauti stali* Scott, 1874 foi a única espécie estudada e o feromônio de agregação (*E*,*E*,*Z*)-2,4,6-decatrienoato de metila foi emitido por machos da espécie (SUGIE et al., 1996). *T. perditor*, *T. custator accerra* e *T. pallidovirens* partilham entre si o éster (*E*,*Z*,*Z*)-2,4,6-decatrienoato de metila e mais outros três compostos sesquiterpênicos, o *α*-curcumeno, zingibereno e o *β*-sesquifellandreno. Contudo, as proporções das misturas dos compostos diferiram entre as espécies, sendo ausente para *T. pallidovirens* e presente para *T. custator accerra* a molécula (*E*)-2-decenal apontada como um composto candidato no reconhecimento entre as espécies, ou seja, no reconhecimento intraespecífico (MCBRIEN et al., 2002; MORAES et al., 2005; EL-SAYED, 2020).

Cappaeini

Dois gêneros e duas espécies foram estudas*, Halyomorpha halys* (Stål, 1855) e *Caura rufiventris* (Germar, 1838), porém somente *H. halys* teve coletado, identificado e testado por bioensaios os compostos denominados como um feromônio de agregação, os epóxi-álcoois murgantiol e suas respectivas configurações (3*S,*6*S,*7*R,*10*S* e 3*R,*6*S,*7*R,*10*S*) (KHRIMIAN et al., 2014; EL-SAYED, 2020). Segundo Rider (2020), o gênero *Halyomorpha* Mayr, 1864 abriga 32 espécies e *H. halys* tem sido considerado de grande importância agrícola, com potencial de abrangência cosmopolita seus danos são relatados principalmente para a olericultura (KRITICOS et al., 2017).

Carpocorini

Agroecus griseus (Dallas, 1851)

Dentro do gênero *Agroecus* comporta duas espécies descritas (RIDER; ROLSTON, 1987), e *A. griseus* foi a única espécie trabalhada até o momento. Os compostos identificados foram: 1-trideceno e o (*Z*)-4-trideceno das glândulas metatorácicas, compostos de defesa, e caracterizado como feromônio sexual emitidos por machos, o 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila (FÁVARO et al., 2012; FÁVARO; ZARBIN, 2013).

Euschistus Dallas, 1851

O gênero agrupa um grande número de espécies de importância agrícola, e aporta o maior número de espécies estudadas dentro da tribo, oito espécies das mais de 70 espécies descritas (BIANCHI et al., 2017; EL-SAYED, 2020; RIDER, 2020). *Euschistus heros* (Fabricius 1791), o percevejo-marrom, tem sido reportada como uma espécie de grande importância agrícola para o cultivo de soja, algodão, girassol, feijão e inclusive para soja transgênica (AGROFIT, 2020). Os compostos feromonais de agregação e sexual foram evidenciados para setes espécies, enquanto para *Euschistus biformis* (Stål, 1862) somente identificou-se compostos de defesa (BORGES et al., 1998; NOGE et al., 2012; EL-SAYED, 2020).

Dos compostos emitidos, o 2*E*,4*Z*-dodecanoato de metila e o 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila foram as moléculas compartilhada como feromônio de agregação. No entanto, observou-se uma variação nas proporções emitidas entre as espécies (ALDRICH et al., 1991; ALDRICH et al., 1994; BORGES et al., 1998).

Dolycoris baccarum (Linnaeus, 1758)

Dolycoris Mulsant & Rey, 1866 comporta dez espécies descritas (RIDER, 2020). Yang e colaboradores (2019) evidenciaram três compostos machos específicos caracterizados como feromônios de agregação para espécie *D. baccarum*, o *trans*-*α*-bergamoteno, *β*-bisaboleno e *α*-bisabolol.

Oebalus poecilus (Dallas 1851) e *Oebalus pugnax* (Fabricius, 1775)

São espécies reportadas para o cultivo do arroz, especialmente *O. poeclius*, o qual tem sido comumente documentado para orizicultura no Brasil (AGROFIT, 2020). Segundo Rider (2020), o gênero comporta nove espécies descritas, que somente duas tiveram trabalhos versado sobre à sua ecologia química, porém somente para *O. poeclius* foi evidenciado a emissão de um composto sexo-específico (EL-SAYED, 2020). Os compostos feromonais estudados e evidenciados foram compostos oriundos da glândula metatorácica e da emissão e bioatividade do composto macho-específico, o zingiberenol 2, como feromônio de agregação para *O. poeclius* (OLIVEIRA et al., 2013).

Tibraca limbativentris Stal, 1860

Reportado também como uma importante espécie-praga para o cultivo do arroz (AGROFIT, 2020), esta espécie até o momento é a única com estudos sobre emissão feromonal (EL-SAYED, 2020). O gênero comporta formalmente seis espécies (FERNANDES; GRAZIA, 1998). Para *T. limbativentris* foi evidenciado a emissão dos isômeros 1*RS*,4*RS*,1'*R*- e 1*RS*,4*RS*,1'*S*-zingiberenol (EL-SAYED, 2020). O papel dos compostos em laboratório os marcou como relacionados a atividade sexual da espécie (BORGES et al., 2006). Recentemente evidenciou-se a emissão também do sesquipepiritol por machos da espécie (BLASSIOLI-MORAES et al., 2020).

Eysarcorini

Eysarcoris Hahn, 1834

Segundo Wood e Mcdonald (1984), o gênero não tem sido registrado para a região Neotropical. Para as duas espécies estudadas (EL-SAYED, 2020) observou-se a investigação do feromônio de agregação para *Eysarcoris lewisi*, (Distant, 1883). A molécula identificada para *E. lewisi* foi o álcool com a configuração 1*S*, 5*S,*6*R* -sesquisabinen-1-ol, enquanto para *Eysarcoris parvus* Uhler, 1896 o *Z*-exo-*α*-

bergamotenal foi caracterizado como um feromônio sexual (MEN, 1999; TAKITA et al., 2008; MORI et al., 2008).

Nezarini

Chinavia Orian, 1965 e *Acrosternum* Fieber, 1860

Antigamente, *Chinavia* Orian era considerado um subgênero de *Acrosternum* Fieber, contudo, após estudos morfológicos, estes se tornaram gêneros a parte, e todas as espécies americanas pertencentes ao *Acrosternum* Fieber foram sinonimizadas para *Chinavia* Orian (SCHWERTNER et al., 2002; SCHWERTNER; GRAZIA, 2007). Assim, *Chinavia* Orian abriga por volta de 84 espécies descritas, sendo muitas de importância agrícola, das quais foram reportadas para vários cultivos como, feijão, soja, arroz, girassol, quiabo, algodão e tomate (FÜRSTENAU et al., 2013; SCHWERTNER; GRAZIA, 2007).

Informações sobre a emissão feromonal foram documentadas para seis espécies, e a bioatividade evidenciada correlacionou-se com o feromônio de agregação, sendo estas moléculas *Z*-*α*-bisaboleno, *cis*-1,2-epóxi-*Z*-*α*-bisaboleno e o *trans*-1,2-epóxi-*Z*-*α*-bisaboleno, que para cada espécie variou a proporção emitida (EL-SAYED, 2020).

Chlorochroa Stål, 1872

O gênero agrupa 25 espécies descritas (RIDER, 2020). Compostos de caráter feromonal foram estudos para somente três espécies (EL-SAYED, 2020). As moléculas encontradas para *Chlorochroa uhleri* (Stål, 1872) e *Chlorochroa lineata* Thomas, 1983 foram os ésteres: (3*R*)-3-(*E*)-6-2,3-dihidrofarnesoato de metila, (2*E*,6*E*)-farnesoato de metila e o (*E*)-2,6,10-trimetil-5,9-undecadienoato de metila, compostos bioativos evidenciados como componentes do feromônio sexual das espécies, entretanto, a proporção emitida diferiu entre as espécies, sendo 100:0,9:0,6 e 100:0,5:0,4, respectivamente (HO; MILLAR, 2001). Para *Chlorochroa sayi* (Stål, 1872) também evidenciou a presença de um feromônio sexual e as identidades referentes a ésteres, o que, no entanto, a identificação das moléculas foram distintas de *C. uhleri* e *C. lineata* (HO; MILLAR, 2001a; EL-SAYED, 2020).

Nezara Amyot e Serville, 1843

Cerca de 23 espécies são descritas para o gênero, o qual aporta a espécie *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758), um percevejo cosmopolita e de grande importância agrícola (MCPHERSON, 2017; AGROFIT, 2020; RIDER, 2020). Espécies desta tribo compartilham moléculas similares, especialmente entre *Nezara* Amyot e Serville e *Chinavia* Orian (EL-SAYED, 2020). Para *N. viridula*, os compostos identificados foram oriundos do extrato de machos evidenciados como feromônio de agregação, o *Z*-*α*-bisaboleno, *cis*-1,2-epóxi-*Z*-*α*-bisaboleno e o *trans*-1,2-epóxi-*Z*-*α*-bisaboleno (BAKER, 1987; ALDRICH et al., 1989). Interessantemente, observou-se uma variação na proporção dos compostos emitidos entre as diferentes regiões geográficas, Brasil, Japão, Itália, Austrália para *N. viridula* (EL-SAYED, 2020).

Pentatomini

Pallantia macunaima Grazia 1980 e *Rhaphigaster nebulosa* (Poda, 1761)

Ambas as espécies foram as únicas dos respectivos gêneros com compostos feromônais estudados, e para *Rhaphigaster nebulosa* identificou-se compostos presentes na glândula metatorácica de adultos bem como para ninfas e adultos de *P. macunaima* (FÁVARO et al., 2011; EL-SAYED, 2020). Ademais, *P. macunaima* também um percevejo de importância agrícola para o cultivo da soja, Fávaro e coautores (2013) coletaram, isolaram e testaram a bioatividade do composto macho-específico, a molécula (6*R,*10*S)*-pallantiona foi caracterizada como o primeiro registro de uma cetona como feromônio sexual produzido por machos dentro da família Pentatomidae.

Pellaea Stål, 1872

O gênero aloca duas espécies descritas, *Pellaea santarosensis* Rolston 1984 e *Pellaea stictica* (Dallas, 1851) (RIDER, 2020). Somente uma espécie estudada, *P. stictica* teve a molécula identificada como feromônio sexual, o álcool 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol (FÁVARO et al., 2015).

Piezodorini

Piezodorus Fieber, 1860

O gênero *Piezodorus* até o momento é o único que apresenta espécies estudadas dentro da tribo (EL-SAYED, 2020). *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) e *Piezodorus hybneri* (Gmelin, 1790) tiveram identificados os compostos evidenciados como um feromônio sexual emitidos por machos para ambas as espécies (LEAL et al., 1998; BORGES et al., 1999; BORGES et al., 2007). *P. guildinii* e *P. hybneri* têm sido reportados para o cultivo da soja e na olericultura; *P. guildinii* possui sua abrangência pelas Américas, e sendo inclusive uma espécie de grande importância agrícola em diferentes países (MCPHERSON, 2017).

Em *P. hybneri*, evidenciou-se a produção do *β*-sesquifellandreno, (*R*)-15-hexadecanolídeo e do 8-(*Z*)-hexadecenoato de metila na proporção de 10:4:1, respectivamente (LEAL et al., 1998). Documentou-se para *P. guildinii* o (7*R*)-sesquifellandreno, o (7*S*)-sesquifellandreno e também a emissão do 2*E*,4*Z*-dodecanoato de metila e do 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, no qual os três compostos (7*R*/*S*; 2*E*,4*Z* e 2,6,10-trimetil) apresentaram na proporção de 40:1:3 (BORGES et al., 1999; BORGES et al., 2007; EL-SAYED, 2020).

Rhynchocorini

Biprorulus Breddin, 1900

O gênero apresenta três espécies descritas (RIDER, 2020), sendo *Biprorulus bibax* Breddin, 1900 a única espécie com estudos sobre a emissão feromonal (EL-SAYED, 2020). O hemicetal, derivado de aldeído e cetona foi o composto majoritário seguido pelo linalool, *E*-*Z*-farnesol e *cis*-nerolidol marcaram-se como feromônio de agregação (OLIVER et al., 1992; JAMES et al., 1994).

Strachiini

Bagrada hilaris (Burmeister, 1855)

Com por volta de quatro descritas para o gênero no mundo (AHMAD, 1981), *B. hilaris* tem sido reportado com uma espécie de grande importância agrícola, e na busca por um controle ecológico via feromônio da espécie, revelou que o composto acetato de (*E*)-2-octenila desempenhou um papel no comportamento sexual, o qual foi evidenciado por bioensaios de curto alcance; o composto bioativo desencadeou o comportamento de cópula na espécie (GUARINO et al., 2008).

Murgantia histrionica (Hahn, 1834)

Por volta de quatro espécies para o mundo (MCPHERSON; AHMAD , 2008; MCPHERSON; AHMAD, 2011), sendo *M. histrionica d*e importância agrícola e reportada para as culturas das espécies cultivadas de Brassicaceae, e sendo os epóxis álcoois murgantiol com as configurações (3*S,*6*S,*7*R,*10*S* e 3*S,*6*S,*7*R,*10*R*) identificados como feromônio de agregação da espécie (KHRIMIAN et al., 2014; MCPHERSON et al., 2017a; EL-SAYED, 2020).

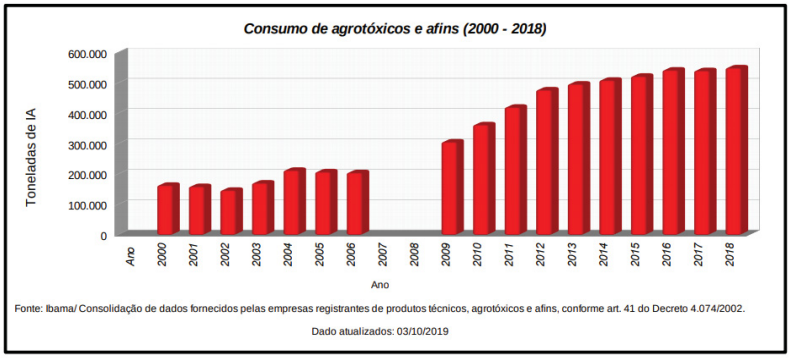
Eurydema Laporte, 1833

O gênero apresenta-se dividido em três subgêneros, *Eurydema* Laporte, *Eurydema* (*Horvatheurydema*) Dupuis, 1951 e *Eurydema* (*Rubrodorsalium*) Stichel, 1944 com quatorze, quatro e dez espécies respectivamente (RIDER, 2020). Quatro espécies tiveram os compostos de alarme investigados oriundos das glândulas metatorácicas (EL-SAYED, 2020). Somente uma espécie, *Eurydema rugosa* Motschulsky, 1861 evidenciou-se a emissão da molécula *trans*-2-hexanal que apresentou uma bioatividade desencadeadora do comportamento de agregação em laboratório (ISHIWATARI, 1976).

2.4.2 Potencialidades do uso de feromônios na agricultura

No aspecto de importância agrícola, as tribos Nezarini e Carpocorini são as que abrigam um grande número de espécies de importância econômica (PANIZZI; LUCINI et al., 2017; AGROFIT, 2020). As espécies de insetos-praga são tidas como competidoras na produção de matéria-prima e alimentos, ao gerarem um grande impacto econômico na produtividade de vários cultivos comerciais (OLIVEIRA et al., 2014). O uso de inseticidas no controle de espécies de percevejos-praga tem sido recorrente, e entre as moléculas de inseticidas utilizadas, os organofosforados, cipermetrinas e as sulfoxaminas são apontados como perigosos a saúde humana e ambiental (AGROFIT, 2020).

Além disso, pesquisas destacam a presença de espécies de pentatomídeos que podem apresentar resistência às moléculas dos inseticidas (KESTER et al., 1984; SOMAVILLA et al., 2020; SOSA-GÓMEZ et al., 2020). A busca por novas moléculas e a utilização movimentam mercado superiores 7 bilhões de dólares (CAMPANHOLA; BETTIOL, 2003; SANTOS, 2012; PELAEZ et al., 2016). Desde o ano 2000 até 2018, o consumo tem aumentado (FIGURA 1) e com isso os riscos também aumentam da contaminação de forma aguada e/ou crônica, da presença de resíduos em alimentos; acrescentam-se também restrições comerciais internacionais devido a presença de resíduos de agrotóxicos além do permitido para as legislações de exportações (STOPPELLI et al., 2005; DE BAPTISTA et al., 2007; HERMIDA et al. 2015; HAN et al., 2018; WHO, 2020, IBAMA, 2020).



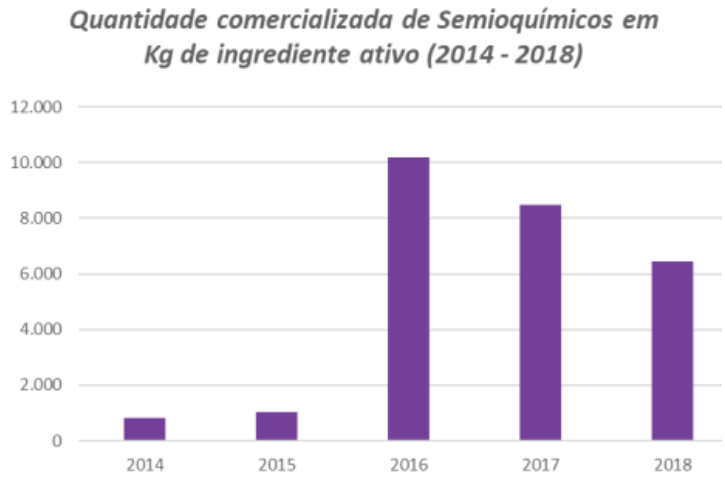
FONTE: IBAMA, 2019

FIGURA 1- Panorama histórico do consumo de agrotóxicos no Brasil (2000-2018)

Em alternativa, as pesquisas com feromônios têm crescido de forma relevante e seu impacto resulta na busca por alternativas ecologicamente corretas

no controle/monitoramento de espécies de importância agrícola de modo espécie-especifico e de menor impacto possível ao meio-ambiente (VILELA, 1992; PINTO-ZEVALLOS; ZARBIN, 2013), isto é, uma vez que os usos de agrotóxicos, especificadamente, os inseticidas, não são espécie-específicos e ainda são os que acarretam efeitos adversos no uso irracional, por exemplo, desenvolvimento de espécies resistentes, contaminação ambiental, presença resíduos em alimentos e na mortandade de insetos benéficos a agricultura (AIZEN, et al., 2009; BRAIBANTE; ZAPPE, 2012; PIMENTEL; PESHIN, 2014; PARA, 2014; HAN et al., 2018; WHO, 2020).

Em campo, pesquisas com feromônios de agregação e sexual têm-se mostrado com grandes potenciais na atuação do monitoramento, controle e amostragem para várias espécies (BENTO et al., 2016), inclusive espécie de percevejos de importância agrícola, citam-se os estudos baseados com testes de campo empregando os compostos sintéticos, Ex. *Biprorulus bibax, Euschistus heros, Euschistus conspersus*, *Piezodorus guildinii*, *Plautia stali* e *Chinnavia spp.* (JAMES et al., 1994; SUGIE et al., 1996; BORGES et al., 1999; KRUPKE, 2001; TILLMAN et al., 2010; BORGES et al., 2011). Assim, buscamos propor alternativas mais racionais e ecológicas no controle de *Mormidea v-luteum* e *Arvelius albopunctatus*. A seguir apresenta-se o gráfico do crescimento das pesquisas atrelado a implementação de semioquímicos na agricultura brasileira entre 2014 a 2018 (FIGURA 2).



FONTE: IBAMA, 2020

FIGURA 2- Utilização dos semioquímicos na agricultura brasileira (2014-2018)

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Coletar, isolar, identificar e checar a bioatividade dos compostos candidatos a feromônio para as espécies *Mormidea v-luteum* (Lichtenstein, 1796) e *Arvelius albopunctatus* (De Geer, 1773) (Heteroptera: Pentatomidae)

3.1.1 Objetivos específicos

(i) Coletar os voláteis emitidos por machos e fêmeas de *Mormidea v-luteum* (Lichtenstein, 1796) e *Arvelius albopunctatus* (De Geer, 1773);

(ii) Identificar compostos sexo-específicos nos extratos oriundos de machos e fêmeas de ambas as espécies;

(iii) Realizar testes de bioatividade com os compostos sexo-específicos candidatos a feromônio;

(iv) Avaliar a dinâmica de produção dos compostos bioativos candidatos a feromônio;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS INSETOS

Adultos e ninfas de *Mormidea v-luteum* e *Arvelius albopunctatus* foram coletados de forma ativa em áreas gramadas com a planta hospedeira, *Paspalum* sp. no campus Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, localizada na cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. Os insetos coletados foram levados ao Laboratório de Semioquímicos localizado no Departamento de Química do mesmo campus. Os insetos em seus diferentes estágios de vida foram acondicionados em caixas, gaiolas de criação (30 centímetros de largura por 40 centímetros de comprimento). As gaiolas continham ambas as laterais teladas para fornecer um fluxo de ar natural. Adultos e ninfas foram separados e alimentados com dieta natural e alternativa a livre escolha. Para os estágios de ninfa e adulto de *M. v-luteum* foram oferecidos a dieta natural, *Paspalum sp* e alternativa com *Ligustrum lucidum* (L.). Para ninfas e adultos de *A. albopunctatus* foram ofertados a dieta natural, frutos de *Solanum lycopersicum* (L.) e *Solanum americanum* Mill. e vargens verdes de *Phaseolus vulgaris* L. como alternativa.

Após constituídas as colônias dos insetos, ovos, ninfas e adultos (virgens) foram separados e monitorados diariamente e alimentados com as dietas descrita acima. As dietas foram trocadas a cada três dias. Adultos virgens de ambas as espécies com cerca de ±3 dias de vida foram sexados e separados para os experimentos seguintes. Todos os procedimentos de criação ocorreram sob condições de laboratório controladas (25 ± 1ºC; 70 ± 10% de umidade relativa; 12h: 12h claro/escuro).

4.2 TÉCNICA DE COLETA DE VOLÁTEIS

4.2.1 Coleta de voláteis de machos e fêmeas de *Mormidea v-luteum*

A coleta dos voláteis foi conduzida pelo sistema de areação contendo um grupo de sete machos e sete fêmeas separados por sexo em câmaras de vidro, quais foram alimentados com dieta natural, *Paspalum* sp. Para aumentar a vida útil da dieta natural dentro das câmaras de aeração, adotou-se frascos de vidro (12 x 4:

altura x diâmetro em centímetros) com água destilada (±100 ml). Os frascos foram vedados com plástico filme para evitar o acúmulo de umidade dentro das câmaras e também para evitar que insetos caíssem dentro do frasco (FIGURA 2). As coletas dos odores ocorrem sob condições de laboratório. A dieta natural ofertada e a água dos frascos foram trocadas a cada três dias. Ressalta-se que durante a troca da dieta, a mesma foi inspecionada para evitar a presença de outros organismos que nela poderiam estar associados, e assim afetar a coleta de voláteis. As inspeções foram realizadas sob estereomicroscópio com magnificação de 10X a 40X. Os modelos de câmaras utilizadas foram as verticais e a coleta dos voláteis ocorreu pelo sistema de aeração por fluxo de ar. Os passos e dimensões das câmaras adotada foram os mesmos descrito no capítulo 1.

FIGURA 2 – Coleta de voláteis oriundos da dieta natural e de machos e fêmeas de *M. v-luteum* separados por câmaras de vidro. Na esquerda (M), câmaras com machos mais dieta natural; na direita (F), câmaras com fêmeas mais dieta natural; no topo das câmaras de vidro, uma coluna contendo o polímero adsorvente (20 mg);

Os voláteis orgânicos naturais foram constituídos pela lavagem das colunas contendo o polímero adsorvente (HayeSep= 20 mg). O período de coleta foi de 24 horas, igualmente para cada amostra. Todos os extratos obtidos foram com solvente bidestilado (hexano), e cada amostra coletada conteve 400 µL (microlitros) finais. As amostras obtidas de cada câmara foram devidamente etiquetadas e acondicionados

em vials de 2 mL. Após coletadas, foram alocadas em freezers a -20 °C para análises posteriores via CG, CG-IVTF, CG-EM e realização de bioensaios com extrato natural (ZARBIN et al., 1999).

4.2.2 Coleta de voláteis de machos e fêmeas de *Arvelius albopunctatus*

Na coleta de voláteis de adultos de *A. albopunctatus*, adotaram-se câmaras de aeração na horizontal (com dimensões de 35 cm de comprimento x 4,5 cm de diâmetro). A dieta natural oferecida constituiu-se de um tomate-cereja (*S. lycopersicum* (L.) e uma vargem (*Phaseolus vulgaris* L.) ofertada para machos e fêmeas. Cada câmara de aeração contou com a dieta natural e dois adultos machos ou fêmeas, ou seja, uma câmara conteve somente machos e outra somente fêmeas. Os procedimentos para extração, condicionamento e preparo das amostras dos odores emitidos por machos e fêmeas mais a dieta natural foram iguais aos descritos anteriormente (ver. Item 4.2.1).

FIGURA 3 – Obtenção dos voláteis oriundos da dieta natural e de machos e fêmeas de *Arvelinus albopunctatus*.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS SEXO-ESPECÍFICOS DE *Mormidea v-luteum* e *Arvelius albopunctatus*

Os extratos de machos e fêmeas de cada espécie foram analisados via a técnica de cromatografia gasosa 'CG' e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas 'CG-EM'. Uma coluna cromatográfica RTX-5 (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25 µm de espessura de filme; J&W Scientific, Folsom, Califórnia, EUA) foi utilizada para análise das amostras. Cada amostra foi concentrada para 100 µL, sendo analisada uma alíquota de 1 µL de cada extrato. O método de temperatura utilizado iniciou-se com o forno a 50ºC durante um minuto. A temperatura do forno ascendeu 7°C a cada minuto até atingir 250°C, e tal temperatura foi mantida durante dez minutos. Para circular a mostra na coluna cromatográfica, hélio foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1 mL minuto^{-1}. Ademais, os extratos também foram analisados por infravermelho. A técnica constitui-se pela junção da cromatografia gasosa com a técnica de espectrofotometria por infravermelho via transformada de Fourier (CG-IVTF). O equipamento utilizado foi o DiscovIR-GC (Spectra Analysis, Marlborough, Massachusetts, USA; 4000-750 35 cm-1). A resolução de trabalho foi de 8 cm^{-1}. O CG contou com uma coluna cromatográfica DB-5 (0,25 µm, 0,25 m x 30 m; J&W Scientific, Folsom, Califórnia, EUA).

Os cálculos do Índice de Retenção (IR), juntamente as coinjeções dos extratos naturais e mais os sintéticos obtidos foram feitos via CG e CG-EM no método citado anteriormente. A determinação do IR seguiu metodologia de Van Den Dool e Kratz (1963). A identificação dos compostos contou com a avaliação do IR, espectros de massas de cada composto, comparados com os dados da biblioteca de dados sobre espectros de massas do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST27 e NIST147), assim como com as análises dos espectros de infravermelho e coinjeções com padrões dos sintéticos obtidos e síntese dos compostos. Para *A. albopunctatus* o processo de identificação e resolução estrutural final ainda estão em processo pelo Laboratório de Semioquímicos da UFPR.

4.3.1 Padrões sintéticos utilizados na identificação dos compostos macho-específico de *Mormidea v-luteum*

Padrões sintéticos dos diastereoisômeros do Zingiberenol, dos grupos *cis* e *trans* foram utilizados, o *trans*-zingiberenol (1*RS*,4*RS*,1'*S*)-zingiberenol e (4-(1',5'-dimethylhex-4'-enyl)-1-methylcyclohex-2-en-1-ol) respectivamente. Os compostos citados foram gentilmente cedidos pelo Professor Dr. Jocelyn G. Millar da Universidade da Califórnia, EUA (University of California, USA). As preparações dos compostos sintéticos e as etapas de síntese para obtenção dos compostos Zingiberenol, Murgantiol e Sesquipiperitol foram preparados em parceria pelo Me. Douglas José Melo, doutorando em Química pela Universidade Federal do Paraná (UFPR) e integrante do Laboratório de Semioquímicos da UFPR, coordenado pelo Prof. Dr. Paulo H. G Zarbin.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS EMITIDOS POR *Mormidea v-luteum* E *Arvelius albopunctatus*

A quantificação de cada um dos voláteis macho-específicos emitidos e candidatos a feromônio foram realizadas via padrão interno. Foi utilizado uma solução do hidrocarboneto tetradecano (10 ng μL^{-1}) para quantificação dos voláteis macho-específico de *M. v-luteum.* No entanto, devido aos compostos candidatos a feromônio de *A. albopunctatus* terem sido emitidos em grandes quantidades, uma curva de calibração foi adotada baseada em soluções de hidrocarboneto pentadecano pesados em balança analítica de alta precisão. As soluções foram preparadas com as seguintes massas (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 ppm). Para esta espécie estabeleceu a produção diária, por fotoperíodo e a taxa de produção (%) de cada composto, bem como o horário de maior emissão dos compostos candidato a feromônio.

4.4.1 Dinâmica de produção dos compostos candidatos a feromônio de *Arvelius albopunctatus*

A dinâmica de produção avaliou a emissão dos compostos no período de 24 horas de 25 extratos. A produção entre o período da fotofase e escotofase, intercalada por 12 horas foram coletadas e amostradas de doze extratos de cada fotoperíodo. Para a fotofase, compreendeu-se entre às 07h00min da manhã até 18h59min. Para escotofase, estabeleceu-se entre às 19h00min da noite até às

06h59min da manhã. Tal etapa contou com um temporizador analógico para alternar entre os fotoperíodos automaticamente. Avaliou-se também a emissão dos compostos a cada 3 horas do fotoperíodo de maior emissão. Para cada intervalo de três horas amostraram-se seis extratos, ou seja, entre os intervalos de (1-3h) seis extratos; (3-6h) seis extratos; (6-9h) seis extratos; (9-12h) seis extratos. Assim, foram avaliados 24 extratos.

Destaca-se que foi utilizado o sistema de areação e as condições de laboratório já previamente descritas. Além disso, os insetos utilizados eram adultos com ±três dias de vida e virgens, e neste experimento foram utilizados dois machos por câmara. Adotou-se o intervalo de três horas devido ser a faixa de intervalo estimada para detecção dos compostos emitidos.

4.5 TESTES DE BIOATIVIDADE COM OS COMPOSTOS SEXO-ESPECÍFICOS CANDIDATOS A FEROMÔNIO DE *Mormidea v-luteum* E *Arvelius albopunctatus*

4.5.1 Bioensaio em olfatometria de *Mormidea v-luteum*

Para avaliação da bioatividade dos compostos macho-específicos de *M. v-luteum* utilizou-se o bioensaio em olfatometria em “Y’. Tal equipamento constitui-se de três tubos de vidro conectados, no qual cada braço e o corpo possuem 20 cm de comprimento, sendo as dimensões totais de (40 cm x 4 cm de diâmetro). Pela presença de dois braços equidistantes, a técnica permite realizar bioensaios de dupla escolha. Os bioensaios foram realizados com o extrato natural e com os compostos sintéticos. Para os bioensaios com o extrato natural, foi ofertado em um braço o controle, dieta natural (*Paspalum* sp) mais solvente (hexano bidestilado), versus o extrato natural de machos mais dieta natural. Para liberar os odores do tratamento (extrato natural + dieta) e do controle (solvente + dieta) foram utilizados papeis filtro nas dimensões de 2 cm² trocados a cada bioensaio juntamente como a dieta natural. O agente carreador dos odores do tratamento e controle dos bioensaios com o extrato natural e sintético, foi ar humidificado e filtrado por carvão ativado que seguiu a 1 L min^{-1} para cada braço do olfatometro em ‘Y’. Após testes pilotos com observações de machos e fêmeas em laboratório e campo, avaliou-se o período de maior atividade de machos e fêmeas. Assim, estabeleceu-se o horário entre 13 e 17 horas como o de maior atividade. Com isso, utilizou-se esta faixa de

horário para realizar os bioensaios com o extrato natural, compostos sintéticos e controle. Foram avaliados os bioensaios com os compostos sintéticos (tratamento) versus hexano (controle). Como agentes liberadores dos compostos sintéticos, utilizaram-se papeis filtro com 2 cm² trocados a cada bioensaio. A concentração utilizada foi baseada na liberação emitida por um inseto, ou seja, 1 macho-específico (1 ME) em 24 horas. Adotou-se tal concentração para o bioensaios com o extrato natural e com os compostos sintéticos quantificados. Os bioensaios com extrato natural foram realizados com machos (N= 41) e fêmeas (N= 45) da presente espécie. Os bioensaios com os compostos sintéticos, as diferentes combinações e o número amostral testado de machos e fêmeas seguiram a tabela abaixo (TABELA 1). Os quais foram constituídos pelos tratamentos: Z= zingiberenol, M= murgantiol e Z+M= zingiberenol + murgantiol, e controle (hexano). Destacam-se que todos os bioensaios foram realizados em condições de laboratório (25± 1ºC; 70 ± 10% UR; Fotofase: 12h). Devido percevejos comumente liberarem feromônios de alarme, após serem sexados, os insetos foram aclimatados por trinta minutos. Tal medida foi tomada para evitar o comprometimento dos bioensaios. Ademais, foram empregados dois olfatômetros de igual tamanho, e sendo alternados a cada bioensaio.

Sexos testados (n)	**Composição dos tratamentos (compostos sintéticos)**				
	Z	**M**	**Z + M**	**Controle**	**(*n*) testados**
Machos/Fêmeas	**+**		**+**	**x**	20/20
Machos/Fêmeas	**+**	**+**		**x**	20/20
Machos/Fêmeas		**+**		**x**	20/20
Machos/Fêmeas	**+**		**x**		20/20

TABELA – 1 Bioensaios em olfatometria em Laboratório com *M. v-luteum*, sendo tratamento versus controle: Presente (+); Versus (x)

4.5.2 Bioensaio em olfatometria em “Y” de *Arvelius albopunctatus*

Os bioensaios em olfatometria em ‘Y’ foram conduzidos em ambiente controlado e seguiu com a utilização dos mesmos instrumentos e procedimento

tomados para a espécie *M. v-luteum*. Contudo, para esta espécie foi avaliado o número amostral de 30 machos e 30 fêmeas. Os testes foram realizados com o controle (hexano bidestilado mais dieta) versus tratamento (extrato natural mais dieta). A dieta natural ofertada foi constituída de um tomate-cereja de (*S. lycopersicum* (L.) e de uma vargem de (*Phaseolus vulgaris* L.). Empregou-se o uso de papeis filtro com 2 cm² como liberadores dos odores dos tratamentos e controle, e a dieta e os papeis filtro foram trocados a cada bioensaio. O período de realização dos bioensaios seguiu o período de maior liberação dos compostos sexo-específicos. A quantidade do extrato aplicado para o tratamento com o odor candidato a feromônio, foi orientada pela produção média diária por inseto em 24 horas (1 ME). Testou-se os odores para machos e fêmeas com dupla chance escolha. Os testes com os compostos sintéticos, não ocorreu, visto o comentário na secção 4.3, no último parágrafo.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Analisaram-se os bioensaios via olfatometria em 'Y' pelo o teste Binomial de dupla escolha. Nos testes por olfatometria, as não respostas, não foram incluídas nas análises. Para averiguar se houve diferença entre a produção média em 24 horas e em cada intervalo de três horas amostradas, adotou-se previamente a checagem da normalidade via o teste Shapiro-Wilk. Devido variância desigual entre a quantidade dos compostos emitidos, adotou-se o teste para dados não pareados Mann-Whitney. Na avaliação da produção dos compostos emitidos a cada três horas foi utilizado o teste para a análise de variância não-paramétrica, Kruskal-Wallis. Para ambos os testes, o *P*-valor adotado foi de (≤0.05). Todos as análises aqui descritas ocorreram no software BioEstat 5.0.

5. RESULTADOS

As espécies *M. v-luteum* e *A. albopunctatus* tiveram os extratos de machos e fêmeas coletados de modo separado por sexo e espécies pelo sistema de aeração, sendo os extratos analisados pelas técnicas de cromatografia gasosa, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e por espectrofotometria por infravermelho. As análises revelaram que nos extratos orgânicos voláteis de machos havia a presença de compostos sexo-específicos. No total, foram seis compostos macho-específicos para a espécie *M. v-luteum* e dois compostos macho-específicos *para A. albopunctatus*. Para o percevejo-do-arroz, *M. v-luteum*, os álcoois tiveram as seguintes identidades: **1** e **2** isômeros do zingiberenol, os compostos **3, 5** e **6** como isômeros do murgantiol e o composto **4**, o sesquipiperitol. Para o percevejo-do-tomate, *A. albopunctatus* parcialmente revelou-se que os dois compostos macho-específicos se tratam de hidrocarbonetos com ligações duplas e com massa carga *m/z* 272. A seguir, o detalhamento dos resultados obtidos para cada espécie separadamente.

5.1 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS MACHO-ESPECÍFICO DE *Mormidea v-luteum*

Os resultados obtidos de 30 extratos de machos e fêmeas de *M. v-luteum* coletados via sistema de areação, e analisados via CG e CG-EM evidenciaram seis compostos como sendo exclusivos dos extratos de machos (FIGURA 4). Dentre os compostos macho-específicos evidenciados, destacaram-se os compostos **1** e **5** como os majoritários detectados nas análises de cada extrato. Diante disso, os compostos majoritários (**1**-**5**), candidatos a feromônio de *M. v-luteum,* representaram 78% da produção total dos seis compostos evidenciados. A produção total diária de cada um dos compostos foi de: (média ± desvio-padrão): **1** (6,31 ± 1,58 ng); **2** (0,63 ± 0,16 ng); **3** (0,59 ± 0,39 ng); **4** (1,01 ± 0,25 ng); **5** (4,75± 0,83 ng); **6** (0,91± 0,56 ng).

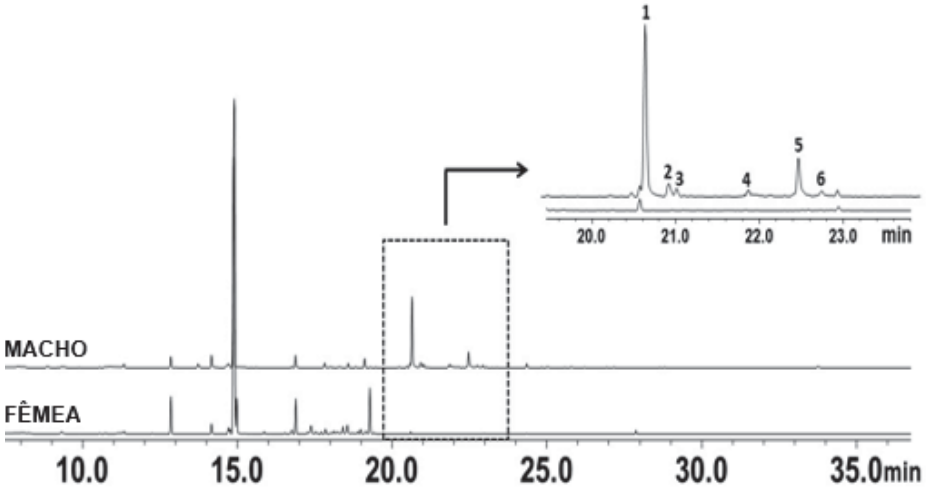


FIGURA 4 – Análise via cromatografia gasosa e comparação dos extratos de machos e fêmeas de *M. v-luteum* (Heteroptera: Pentatomidae). Em destaque os compostos macho-específicos (1- 6).

Os respectivos índices de retenção de cada um dos compostos macho-específicos candidatos a feromônio evidenciados foram: (**1**: 1623, **2**: 1642, **3**: 1647, **4**: 1701, **5**: 1740, **6**: 1757) via coluna (RTX-5). As análises via CG-EM dos compostos naturais candidatos a feromônio apresentaram as fragmentações contidas a seguir (FIGURA 5). Salienta-se que as fragmentações dos compostos **1**, **2** e **4** evidenciaram o mesmo pico base e um similar arranjo das fragmentações. O pico base, ou seja, o fragmento de maior abundância para os referidos compostos observado continham os fragmentos (picos) de *m/z* 119 (100%). O pico do íon molecular dos respectivos compostos foram para o composto **1** *m/z* 222 (3%), e para os compostos **2** e **4** *m/z* 204 (25%). Enquanto para os compostos **3**, **5** e **6**, o pico base foi de *m/z* 93. O fragmento do aparente íon molecular para o composto **3** foi de *m/z* de 202 (7%) e 220 para **5** e **6** (7%).

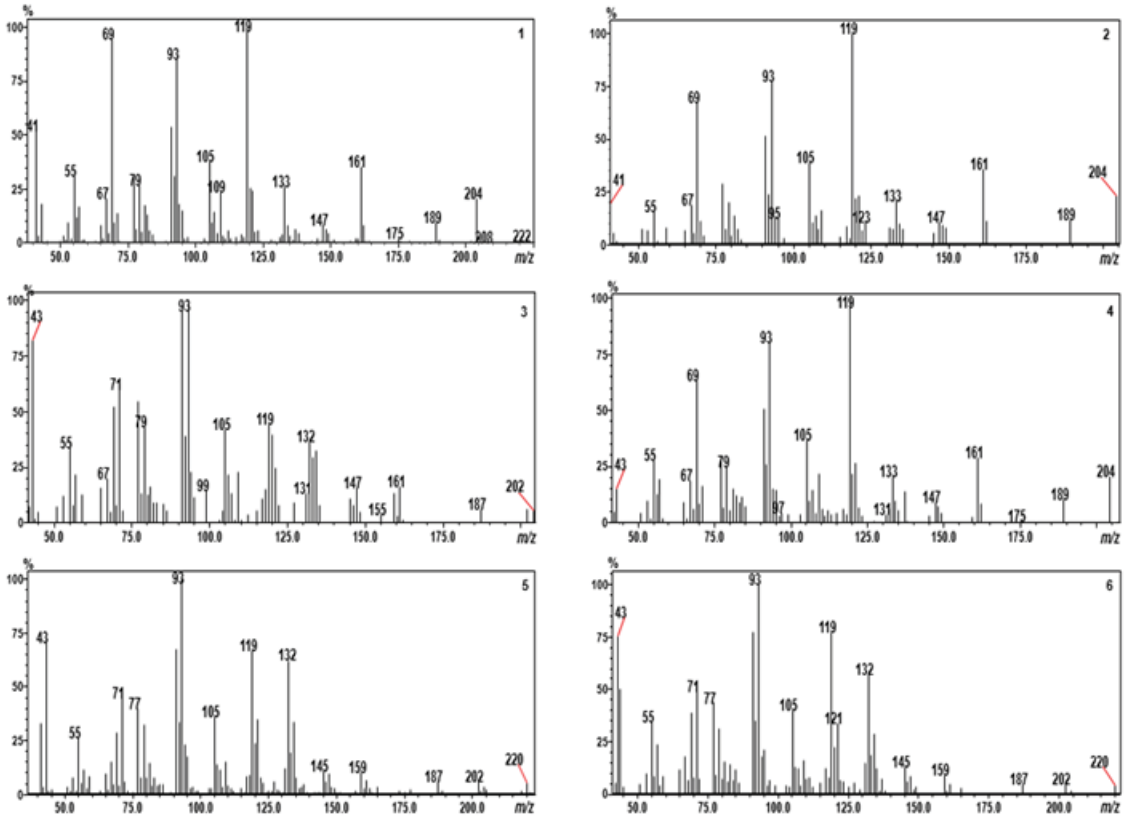


FIGURA 5 – Espectro de massas dos compostos produzidos por machos de *M. v-luteum* (Heteroptera: Pentatomidae) (**1**- **6**).

Diante da similaridade observada, tal cenário indicou a possibilidade da caraterização e presença de estereoisômeros entre os compostos macho-específicos candidatos, **1** e **2**, ou seja, compostos com as mesmas fórmulas moleculares, mas com um arranjo espacial diferente. As fragmentações aqui destacadas contribuem na identificação do determinado composto, pois atuam com uma assinatura, que combinadas com as demais fragmentações auxiliam na identificação e caracterização de uma molécula. Assim, a caracterização dos compostos **1** e **2** sugere-se como sendo isômeros do sesquiterpeno do Zingiberenol. Ao passo que os compostos **3**, **5** e **6** sugerem serem isômeros do murgantiol.

5.1.1 Caraterização dos grupos funcionais dos compostos majoritários candidatos a feromônio de *Mormidea v-luteum*

Na presença dos seis compostos candidatos, destacam-se os compostos **1** e **5**, que além de serem os compostos majoritários do extrato, foram também compostos que derivaram os demais, como foi evidenciado pela similaridade das

fragmentações. Assim, a seguir, o espectro de massa dos compostos majoritários e o espectro na região do infravermelho obtido pelo CG-IVTF (FIGURA 6). Destaca-se na análise por infravermelho uma banda larga do composto **1**, na faixa de 3363 cm^{-1}, caraterístico da função álcool (OH). O espectro na região do infravermelho do composto **5** também apresentou a mesma caraterística, uma banda de estiramento alargado em 3369 cm^{-1}. Além disso, observou-se o estiramento das bandas em 1255 cm^{-1} e 919 cm^{-1}, as quais sinalizaram a presença de anel epóxi, e assim revelando a presença de um epoxi-álcool.

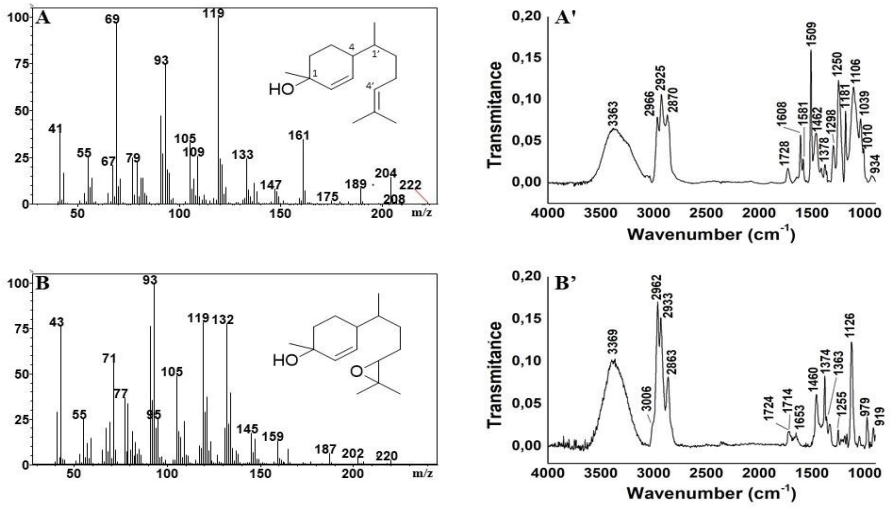


FIGURA 6 – Espectros de massas e infravermelho dos compostos macho-específicos majoritários (1 e 5) de *M. v-luteum* (Heteroptera: Pentatomidae). Espectros de massas à esquerda referentes aos compostos **1= A** e **5= B**, e a esquerda dos infravermelhos dos respectivos compostos **A'** e **B'**.

5.1.2 Co-injeção e confirmação compostos candidato a feromônio de *Mormidea v-luteum* (**1**-**6**)

A identidade dos compostos macho-específicos foi evidenciada pela comparação da co-injeção dos compostos naturais e sintéticos (FIGURA 7). Para os compostos **1** e **2** utilizou-se a mistura *cis*- e *trans* dos isômeros do zingiberenol. Os compostos foram identificados como sesquiterpenóides isômeros do zingiberenol (**1**, **2)**, do murgantiol (**3, 5** e **6**) e do sesquipepiritol (**4**).

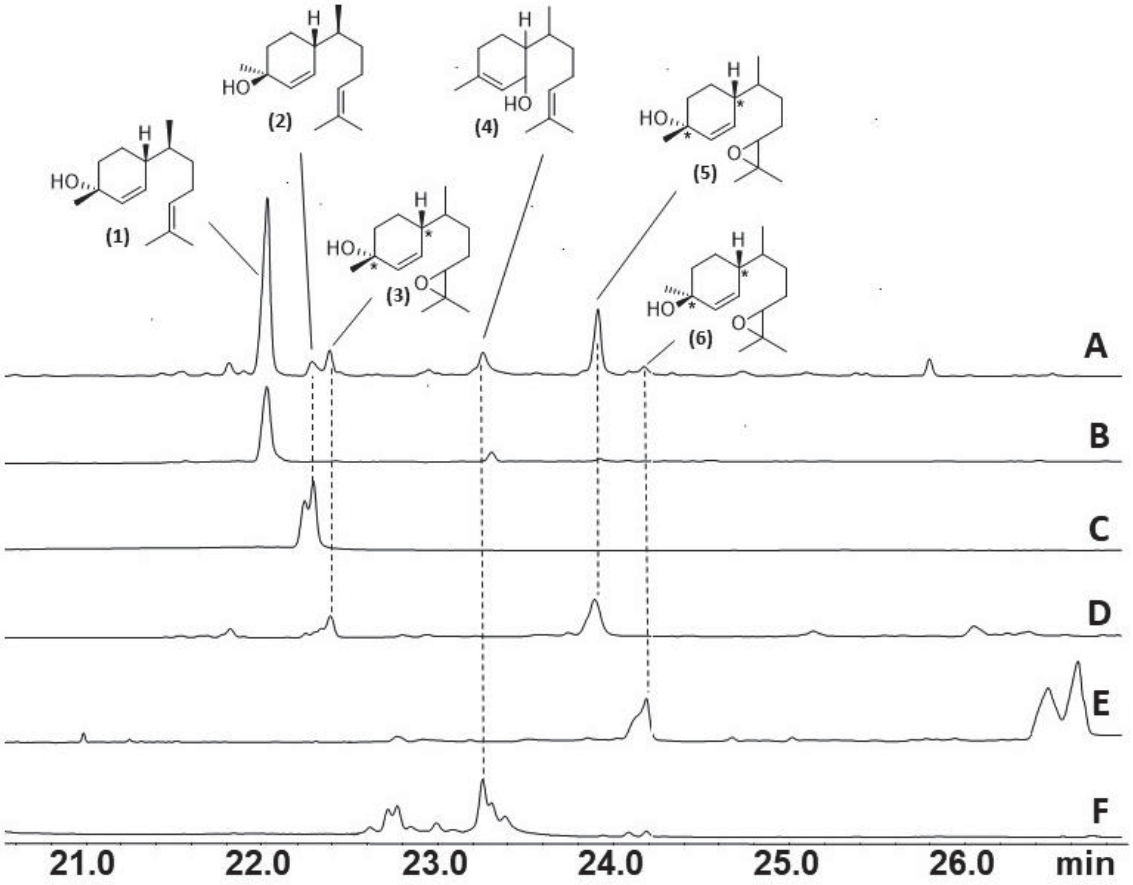


FIGURA 7 – Co-injeção e identificação dos compostos machos-específicos majoritário de *M. v-lutuem* (Heteroptera: Pentatomidae) (**1- 6**). Cromatograma dos compostos naturais **A** (**1- 6**) e coinjeções com os compostos sintéticos (**B-F**). Onde, (**B**) isômero *cis* do sintético (1'*S*)-zingiberenol; (**C**) isômero *trans* do sintético (1'*S*)-zingiberenol; (**D**) isômero *cis* do murgantiol (**E**) isômero *trans* do murgantiol, e (**F**) a mistura dos isômeros do sesquipiperitol. A estereoquímica dos compostos sintéticos e seus respectivos estereocentros estão assinalados com (*).

A resolução da configuração absoluta para os isômeros *S'*, *R' ou R' e S'* do zingiberenol foi revelado pela separação dos isômeros do zingibereno desidratados, sendo analisados o sintético e natural do gengibre e derivado do extrato natural de machos de *M. v-luteum* e os quais foram analisados por CG com uma coluna quiral β-DEX 325 (FIGURA 8). Com isso, observou-se que os isômeros oriundos do extrato natural de machos de *M. v-luteum* e do composto sintético compartilharam a configuração (4*R*,1'*S*) do extrato do óleo essencial desidratado de gengibre, revelando assim sua configuração absoluta.

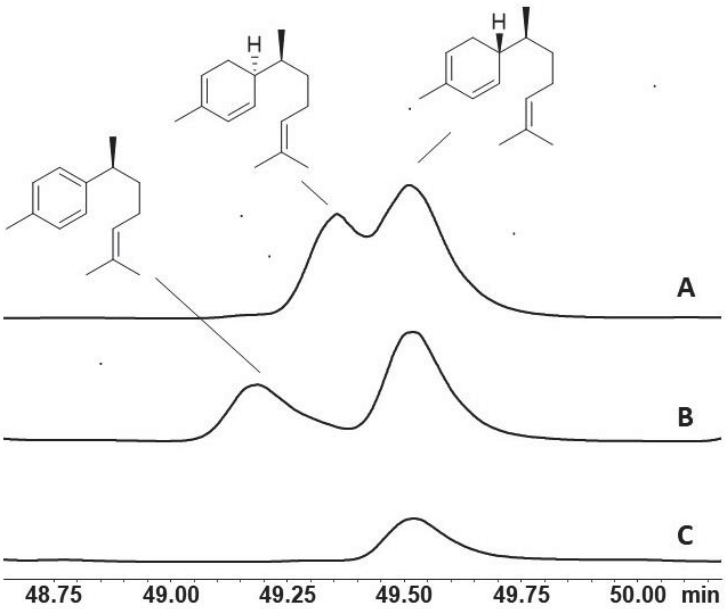


FIGURA 8 – Comparação dos cromatogramas dos zingiberenos. **A**, isômeros sintéticos *cis* e *trans* do (1'*S*)-zingibereno; **B**, zingibereno (4*R*,1'*S*) natural do óleo do gengibre; **C**, Zingibereno derivado do extrato natural de machos de *M. v-luteum*.

5.1.3 Bioensaios em Olfatometria em 'Y' com os compostos naturais e sintéticos de *Mormidea v-luteum*

Bioensaios realizados em laboratório com adultos machos e fêmeas de *M. v-luteum* que testados em olfatômetros em 'Y', apresentaram atratividade para o tratamento com o extrato natural dos compostos macho-específicos emitidos e identificados. Os resultados evidenciaram a atuação dos compostos macho-específicos naturais como sendo de agregação. Nos resultados obtidos, fêmeas testadas apresentaram uma grande atração para o extrato natural de machos + dieta natural (P= 0.003) versus o controle (dieta natural + solvente= hexano), e sendo também os machos testados e atraídos significativamente para o extrato natural de machos mais dieta natural (P= 0.05) (FIGURA 9).

FIGURA 9 – Bioensaios em olfatometria em 'Y' com os compostos naturais macho-específicos de *M. v-luteum* (Heteroptera: Pentatomidae). Com d+n = dieta natural; Resultados significativos (*) $P \leq 0.05$.

Bioensaios empregando o composto majoritário sintético **1**: (1'*S*)-zingiberenol foram realizados via olfatometria em 'Y'. Os resultados mostraram que machos e fêmeas foram atraídos significativamente para o tratamento versus controle (hexano) (fêmeas: P= 0.001, e machos: P= 0.01). Porém, o segundo composto macho-específico sintético majoritário **5**: (1'*S*)-murgantiol testado via olfatometria, somente fêmeas apresentaram atratividade significativa versus controle (hexano) (fêmeas: P= 0.002). Os machos por sua vez, não difeririam significativamente entre o tratamento e controle (machos: P= 0.422) (FIGURA 10).

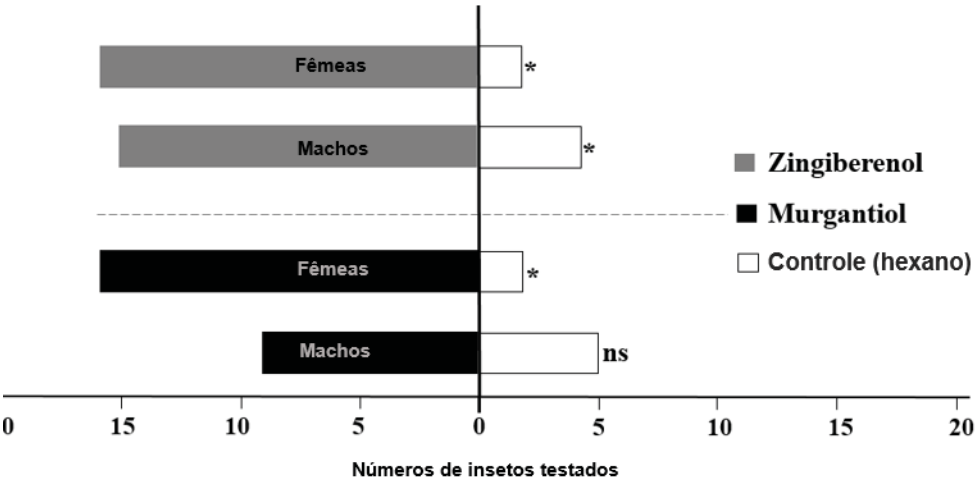


FIGURA 10 – Bioensaios em olfatometria em 'Y' com os compostos sintéticos majoritários e macho-específicos de *M. v-luteum* (Heteroptera: Pentatomidae). Resultados não significativos (ns: $P > 0.05$); Resultados significativos (*) $P \leq 0.05$.

Em vista dos bioensaios anteriores resultarem diferentes respostas dos compostos majoritários quando sozinhos, em especial o (1'*S*)-murgantiol, assim,

avaliou-se a bioatividade da mistura dos compostos majoritários sintéticos (1'*S*)-zingiberenol (**1**) e (1'*S*)-murgantiol (**5**) via olfatometria em 'Y'. Os resultados revelaram que a composição da mistura dos compostos foi significativamente atrativa para machos (P= 0.004) e para fêmeas (P = 0.004) versus o controle (hexano) (FIGURA 11). Devido ao composto majoritário (1'*S*)-zingiberenol atrair ambos sexos quando sozinho ou misturado com o (1'*S*)-murgantiol, a sua bioatividade foi testada frente a mistura do (1'*S*)-zingiberenol e (1'*S*)-murgantiol. Os dados obtidos evidenciaram que fêmeas de *M. v-luteum* foram significativamente atraídas pela mistura (fêmeas, P= 0.007), enquanto os machos testados não discerniram significativamente entre a mistura dos compostos majoritários sintéticos versus o (1'*S*)-zingiberenol sozinho (machos, P= 0.26).

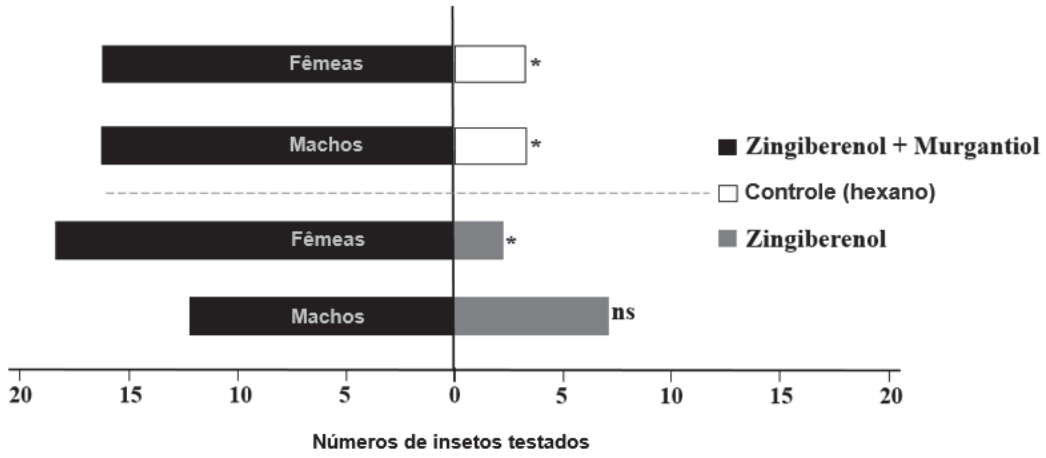


FIGURA 11 – Bioensaios em olfatometria em 'Y' com a mistura dos compostos sintéticos majoritários de *M. v-luteum* (Heteroptera: Pentatomidae). Resultados não significativos (ns: $P > 0.05$); Resultados significativos (*) $P \leq 0.05$.

5.1.4 Identificação e quantificação dos compostos macho-específicos de *Arvelius albopunctatus*

Dos 43 extratos de machos e fêmeas coletados via sistema de areação de *Arvelius albopunctatus*, que analisados via CG e CG-EM evidenciaram a presença de dois compostos detectados exclusivamente nos extratos de machos (FIGURA 12). Os dois compostos foram previamente caraterizados como composto (**1**) o minoritário, e o segundo o majoritário (**2**). Assim, indicam-se estas substâncias como sendo compostos macho-específicos candidatos a feromônio *A. albopunctatus*.

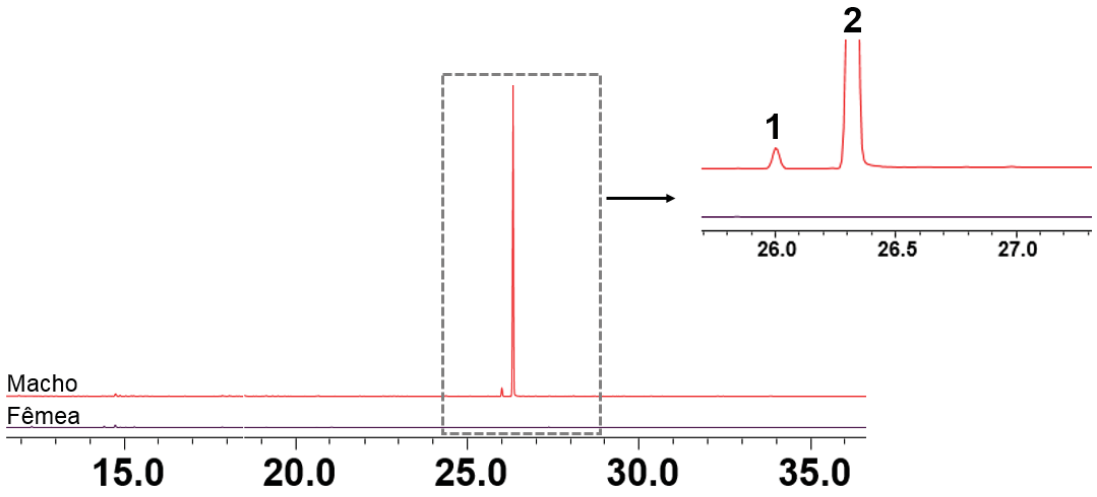


FIGURA 12 – Comparação dos cromatogramas do extrato de machos e fêmeas de *Arvelius albopunctatus* (Heteroptera: Pentatomidae) dos e a evidenciação compostos macho-específicos (**1-2**).

Inicialmente, os respectivos espectros de massas dos compostos (**1-2**) e as análises dos espectros de infravermelho seguem abaixo (FIGURA 13). Estes dados fornecem pistas importantes que auxiliam na identificação das moléculas e seus grupos funcionais. A análise de espectrometria de massa dos compostos (**1-2)** revelou uma grande similaridade entre as fragmentações detectadas. Em ambos os compostos se detectaram o mesmo pico base com *m/z* 93 (100%) que pode indicar a presença de um anel com dupla ligação. Ocorreu também a presença do mesmo íon molecular (M^+) pra os dois compostos, *m/z* 272 (M^+), que respondem a massa final do composto. Assim, preliminarmente, os dois compostos possuem afinidades via a análise por espectrometria de massas, o que poderia ser atribuído pela ocorrência de isômeros. A identificação final dos dois compostos ainda está em fase de andamento pelo Laboratório de Semioquímicos da UFPR.

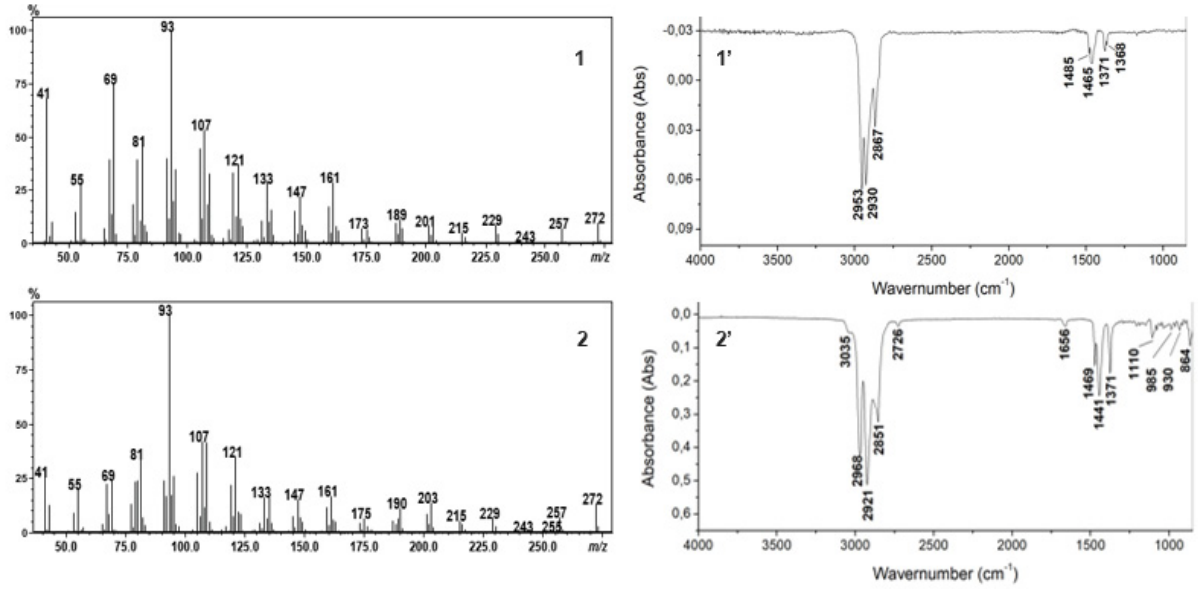


FIGURA 13 – Espectros de massas e análise por infravermelho do extrato natural de macho-específicos de *Arvelius albopunctatus* (Heteroptera: Pentatomidae).

Nas análises por infravermelho, as bandas, ou os estiramentos evidenciados na região do número de onda (*wavenumber*) menor que 3000 (cm^{-1}) do composto **1**, aponta a presença de um hidrocarboneto com ligações duplas. Embora para o composto **2**, que também indica a presença de um hidrocarboneto, a banda de estiramento em 3035 (cm^{-1}) sugere a ocorrência de uma estrutura aromática.

5.1.5 Dinâmica de produção dos compostos macho-específicos de *Arvelius albopunctatus*

O resultado obtido de 25 extratos de macho coletados pelo período de 24 horas revelou a produção diária e por inseto macho adulto virgem. A produção por inseto entendeu-se por 1 macho-específico (1 M.E) dos compostos candidatos feromônio, do minoritário **1** e do majoritário **2** (FIGURA 14). A produção média correspondeu por (média ± desvio-padrão): **1** (0,35 ± 0,72 ppm) e **2** (7,04 ± 6,8 ppm);

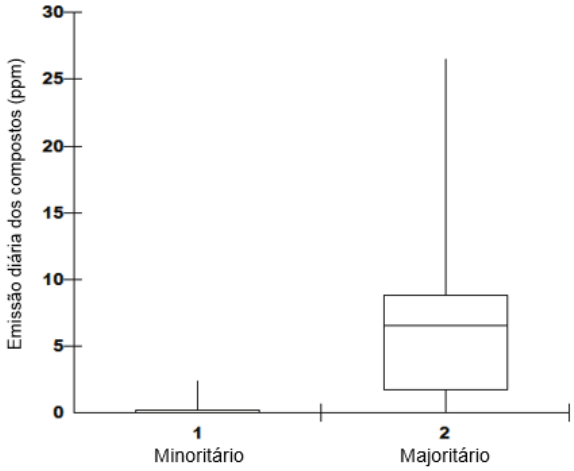


FIGURA 14 – Variação na emissão diária dos compostos minoritário (**1**) E Majoritário (**2**) DE *Arvelius albopunctatus* (Heteroptera: Pentatomidae) (ppm).

A produção diária amostrada produzida por 1 macho específico (1 ME) do composto (**1**) foi relativamente baixa, ao incluir uma amplitude inferior de 5 ppm. Por outro lado, a produção do composto (**2**) oscilou consideravelmente. De acordo com o box-plot exibido, o valor do segundo quartil (Q2) (linha interna da caixa) apresentou-se deslocado em direção ao terceiro quartil (Q3). Com isso, sugeriu uma mediana assimétrica a esquerda, e o que refletiu na amplitude dos dados da quantificação evidenciados serem altamente discrepante, ou seja, entre o menor e o maior valor obtido do composto (**2**), o majoritário. A proporção da emissão entre o composto minoritário e majoritário pôde ainda ser observada pela disposição dos dados em porcentagem dos respectivos compostos em 24 horas de coleta (FIGURA 15). O composto minoritário representou 4,9%, enquanto o majoritário 95,1% da produção média.

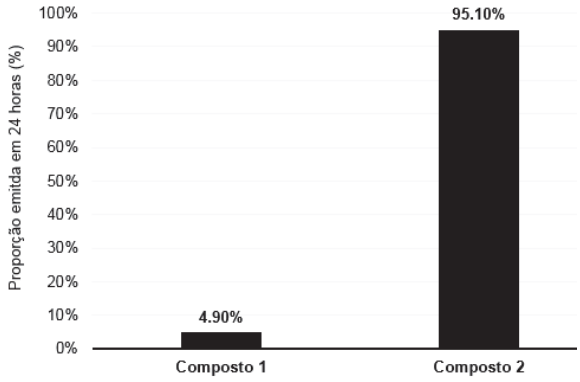


FIGURA 15 – Proporção dos compostos minoritário (**1**) e majoritário (**2**) de *Arvelius albopunctatus* (Heteroptera: Pentatomidae) emitidos em 24 horas (%).

Além da produção diária, esforços foram desempenhados para estimar a produção destes compostos entre os fotoperíodos, da fotofase e escotofase a 1 M.E. Os resultados de doze extratos colhidos na fotofase e doze extratos colhidos na escotofase evidenciaram que os compostos macho-específicos foram produzidos em sua maior quantidade na escotofase (FIGURA 16). A produção média de cada composto durante fotofase foi de 0,003 ppm do minoritário (**1**) e de 0,78 ppm para o majoritário (**2**). No período somente da escotofase, a média obtida foi de 1,34 ppm para o composto minoritário (**1**), um aumento de mais de 200% na produção em relação a fotofase. Para o majoritário (**2**) a produção média amostrada foi de 16,17 ppm, um aumento altamente expressivo também no período da escotofase. Assim, os resultados revelaram a produção dos compostos macho-específicos de *Arvelius albopunctatus* serem produzidos em sua maior relevância no período da escotofase.

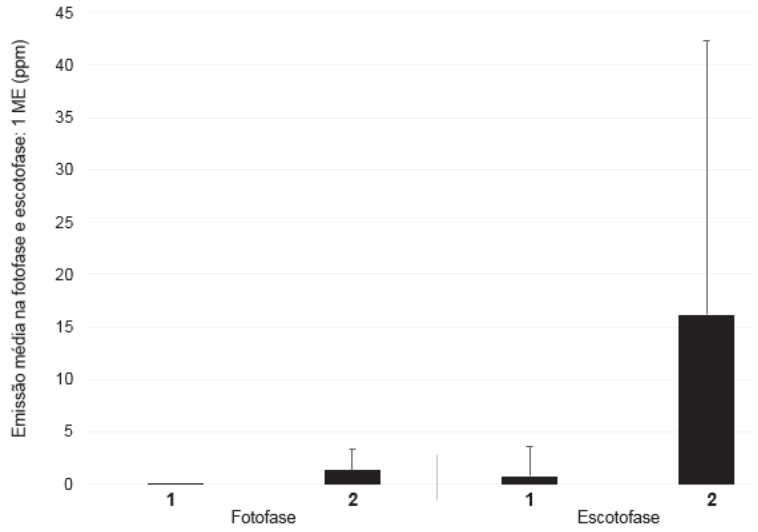


FIGURA 16 – Produção média dos compostos minoritário (**1**) e majoritário (**2**) de *Arvelius albopunctatus* (Heteroptera: Pentatomidae) por fotoperíodo.

Uma vez evidenciado o período de maior produção dos compostos sexo-específicos candidatos a feromônio de *A. albopunctatus,* analisou-se então, a emissão destes compostos a cada 3 horas da escotofase. Assim, as médias de produtividade e desvio-padrão de cada composto foram de: (1-3h: **1**= 0,02±0,02; **2**= 6,13± 5,48); (3-6h: **1**= 0,01±0,02; **2**= 7,89±3,71); (6-9h: **1**= 0,05±0,09; **2**= 4,86±5,41); (9-12h: **1**= 0,85±1,46; **2**= 9,49±12,01) (FIGURA 17).

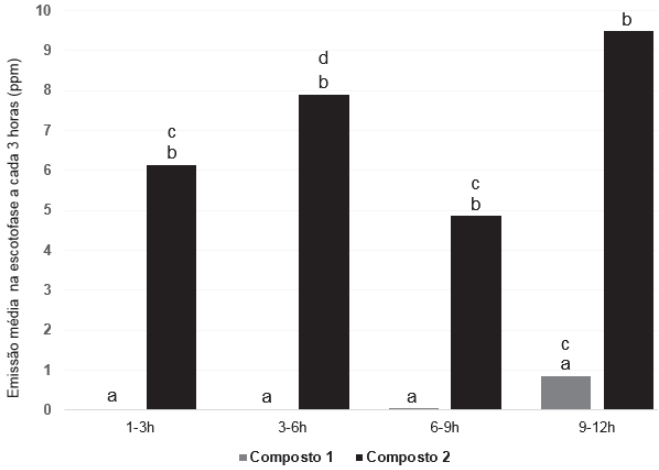


FIGURA 17 – Produção média dos compostos minoritário (**1**) e majoritário (**2**) de *Arvelius albopunctatus* (Heteroptera: Pentatomidae) a cada 3 horas da escotofase. Letras iguais indica que não houve diferença estatística dentre as amostras avaliadas pela análise de Kruskal-Wallis

Os resultados apontaram que houve diferença estatística entre a produção média do composto minoritário **1**, e do composto majoritário **2** para todos os intervalos de horas amostrados da escotofase. Embora os intervalos de produção do composto **1** não terem apresentado diferença significativa nas subsequentes horas amostradas, foi no último intervalo da escotofase (9 -12h) que a produção deste composto aumentou. Para o composto **2**, não houve diferença significativa entre os intervalos amostrados. No entanto, pode-se notar uma flutuabilidade da produção entre as 12 horas da escotofase amostrada.

5.1.6 Bioensaios em olfatometria em 'Y' de *Arvelius albopunctatus*

Após realizada a dinâmica de produção dos compostos emitidos, os bioensaios que foram realizados no período da escotofase também levaram em conta a produção por inseto. Os bioensaios realizados em olfatometria em 'Y' empregado o extrato natural de machos adultos e virgens de *A. albopunctatus* evidenciaram uma atratividade altamente significativa de fêmeas virgens (n=30; tratamento= 22; controle 4; não-resposta 4) ($P<0.05^*$). Por outro lado, dos machos virgens testados (n=30; tratamento= 8; controle= 16; não resposta 6) não foram atraídos para o extrato do macho de *A. albopunctatus* (ns) ($P> 0.05$) (FIGURA 18). Assim, estes resultados indicaram que os compostos macho-específicos de *Arvelius*

albopunctatus possuem um caráter de feromônio sexual, ou seja, atuam na atração do sexo oposto pelo teste binomial.

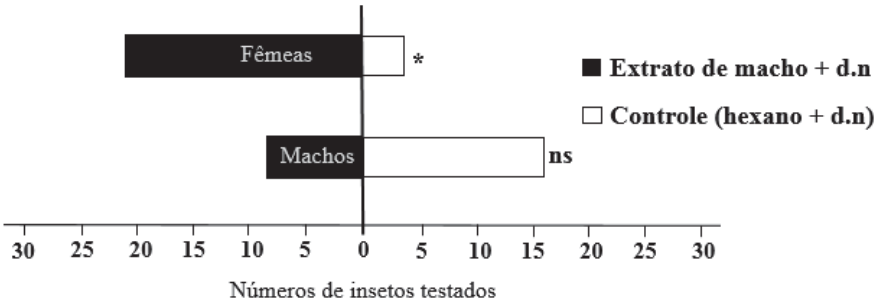


FIGURA 18 – Respostas de adultos machos e fêmeas de *Arvelius albopunctatus* (Heteroptera: Pentatomidae) ao extrato natural de machos a 1 ME. Resultados não significativos (ns: $P > 0.05$); Resultados significativos (*) $P \leq 0.05$.

6 DISCUSSÃO

Para Pentatomidae, os feromônios sexuais e de agregação têm sido documentados sexo-específicos e pelos machos emitidos (EL-SAYED, 2020). Neste aspecto o mesmo evidenciou para as duas espécies estudadas, a emissão de compostos sexo-específicos pelos machos de cada espécie. Interessantemente, os compostos emitidos por machos de *M. v-luteum* já foram identificados para outras espécies de pentatomídeos, e sendo em grande parte incluídos na subfamília Pentatominae como observado para *T. limbativentris* e *O. poecilus*, nas quais o composto zingiberenol caracterizou-se como feromônio sexual (OLIVEIRA et al. 2013; BLASSIOLI-MORAES et al. 2020; EL-SAYED, 2020). Em paralelo, o composto murgantiol caracterizou-se como um feromônio de agregação identificado para *M. histrionica* e *H. halys* através de bioensaios (ZAHN et al. 2008; KHRIMIAN et al. 2014). Ademais, o componente **4**, sesquipiperitol, também foi detectado para as espécies *T. limbativentri* e *M. histrionica* e aponta-se como um precursor biossintético para as os compostos zingiberenol e murgantiol (LANCASTER et al. 2018). Notadamente, o registro da emissão dessas moléculas, zingiberenol e murgantiol, nunca tinha sido registrado para uma única espécie de inseto.

A estereoquímica absoluta dos isômeros do zingiberenol foram determinados para o composto **1**: (1*S,*4*R,*1'*R*) e o **2**: (1*R,*4*R,*1'*S*) com base nas coinjenções dos isômeros sintéticos *cis* e *trans* do zingiberenol, o qual diferem na polaridade e tempo de retenção (KHRIMIAN et al. 2014a; KHRIMIAN et al., 2014b, KHRIMIAN et al., 2015), e através da desidratação dos compostos naturais e sua comparação com os compostos naturais do óleo de gengibre (KREISER; KÖRNER 1999; OLIVEIRA et al. 2013). Aponta-se o composto **1** como o primeiro registro de um produto natural, enquanto o composto **2** foi previamente identificado para *O. poecilus* (OLIVEIRA et al., 2013). Para os compostos, **3**, **5** e **6** a estereoquímica absoluta ainda precisa ser determinada. Contudo, a estereoquímica parcial dos compostos **3** e **5** com seus respectivos estereocentros foi apontada como (1**S*, 4**S*) enquanto para o composto **6**: (1**R*, 4**S*). Ratifica-se que a identificação foi baseada em coinjeções com amostras dos compostos sintéticos dos isômeros *cis*- e *trans*- do murgantiol. A mesma estereoquímica relativa foi observada para os compostos **3** e **5** foi encontrada em machos de *M. histrionica* (KHRIMIAN et al. 2014b). Ademais, o zingiberenol e o murgantiol, e outros compostos

sesquiterpênicos e sesquiterpernoides têm sido reportados como feromônios em Pentatomidae, por exemplo, o bisaboleno, bisabolol, *β*-sesquifellandreno e o α-curcumeno (KHRIMIAN et al. 2014a, KHRIMIAN et al. 2014b; YANG et al. 2019).

No contexto da bioatividade, compostos macho-específicos são comumente emitidos para atrair o sexo oposto, no caso o feromônio sexual, ou ambos os sexos, o feromônio de agregação (ALDRICH et al. 1991; BERGMANN et al. 2009; MORAES et al. 2008). Em *M. v-luteum*, observou-se que os compostos macho-específicos podem desencadear diferentes comportamentos; os bioensaios sugerem que o isômero zingiberenol provavelmente atua como um feromônio de agregação, mediando a respostas de ambos os sexos, enquanto o murgantiol mostrou-se atrativo somente para fêmeas. Assim, os resultados sugerem uma combinação bifuncional da mistura destes compostos naturais, os quais podem representar uma dupla de respostas, isto é, um feromônio de agregação-sexual. Para o percevejo *Piezodorus hybneri*, o qual foram evidenciados a emissão de três compostos macho-específicos, os testes em olfatometria mostraram que ambos os sexos foram atraídos pela mistura dos compostos sintéticos macho-específicos e que machos desempenharam o comportamento de pré-cópula em resposta ao feromônio sintético (LEAL et al., 1998).

Pentatomídeos pertencentes a tribo Carpocorini geralmente compartilham as mesmas plantas hospedeiras (GARBELOTTO; CAMPOS, 2014). *Tibraca limbativentris* tem sido reportado alimentando-se do colmo de arroz e gramíneas (Poaceae), enquanto *M. v-luteum* reporta-se atacando durante a formação da semente do arroz e gramíneas (FERREIRA; DA SILVA MARTINS, 1984; FERREIRA et al., 2001). *Oebalus poecilus* e *M. v-luteum* são considerados espécies próximas e ainda tem sido observado que se alimentam de arroz e inclusive no mesmo estágio (FERREIRA et al. 2001; ROLSTON, 1978). Interessantemente, todas as três espécies produzem e são atraídas pelo zingiberenol, mas este composto ocorre em diferentes composições e aparentemente desempenham diferentes papeis como feromônio sexual e de agregação para essas espécies. Ao passo de emitirem os mesmos compostos, o hábito de vida alimentar, o período de alimentação e a diferente composição dos compostos feromonais de *T. limbativentris* podem evitar uma possível atratividade cruzada entre as espécies, conhecido como ‘‘*cross-attraction*’’. Em complemento, evidencias de sinais vibracionais e a diferente estereoquímica dos compostos naturais emitidos podem desempenhar importantes

papeis no hábito de vida das espécies de pentatomídeos (COKL; BORGES 2017; MCBRIEN et al. 2002b; VIRANT-DOBERLET; COKL, 2004).

Os bioensaios com os isômeros do murgantiol atraíram somente fêmeas de *M. v-luteum*, pode-se evidenciar o seu papel como feromônio sexual. Em oposto, para *M.* histrionica e *H. halys* os quais produzem os mesmos compostos, o papel comportamental observado foi relacionado como um feromônio de agregação (ZAHN et al. 2008). Na subordem Heteroptera, um cenário similar pode ser observado, o qual o sesquiterperno *trans-α*-bergamoteno; um composto natural identificado como feromônio sexual para *Leptoglossus zonatus* (Dallas, 1852) (Heteroptera: Coreidae) (INOUE et al. 2019), foi descrito para *Dolycoris baccarum* (Heteroptera: Pentatomidae) como um componente do seu feromônio de agregação (YANG et al. 2019).

Das espécies contidas na subfamília pentatominae, poucas foram estudadas, isto é, em comparação a biodiversidade do grupo relacionado às pesquisas com feromônios (GRAZIA et al., 2015; EL-SAYED, 2020). Para *Arvelius albopunctatus*, o qual pertence a tribo pentatomini, tem somente três espécies estudadas até o momento, e somente *Pellaea stictica* e *Pallantia macunaima* tiveram evidenciados a emissão de compostos macho-específicos e caracterizados por bioensaios como feromônio sexuais das respectivas espécies (FÁVARO et al., 213; FÁVARO et al., 2015). Bioensaios com adultos virgens de *A. albopunctatus* revelaram a atratividade significativa de fêmeas aos produtos naturais sexo-específicos produzido por machos da espécie, enquanto o oposto evidenciou para machos testados. Compostos desencadeadores do comportamento sexual, isto é, feromônios sexuais têm sido majoritariamente evidenciados para tribo pentatomini (EL-SAYED, 2020). Notavelmente, *P. macunaima* revelou-se emitir o produto natural (6*R,*10*S*)-pallantiona, como a inédita cetona produzida dentro da família Pentatomidae (FÁVARO et al., 2013; EL-SAYED, 2020). A identificação dos compostos emitidos por machos de *A. albopunctatus* e testados por bioensaios ainda precisam ser concluídos, porém sugerem-se serem compostos inéditos para literatura.

Por outro lado, a dinâmica de produção de compostos feromônais entre os pentatomídeos tem sido variado e, com isso, a reposta ser correlacionado ao hábito de vida da espécie (FISH; ALCOCK, 1973; HO; MILLAR, 2001a; BORGES et al., 2007; ZARBIN et al., 2012). A investigação da liberação dos compostos macho-

específico de *A. albopunctatus* ocorreu durante a escotofase, o que se sugere ser o período de maior atividade da espécie.

De um modo geral, os estudos realizados para *Mormidea v-luteum* e *Arvelius albopunctatus* colaboram e abrem portas para os campos da área comportamental, da Ecologia e do Manejo Integral de Pragas com o monitoramento dessas espécies em campo no futuro. Com isso, os nossos resultados avançam importantes passos na elaboração de estratégias de monitoramento via armadilha feromonal para *M. v-luteum* em campo, e assim contribuindo para uma agricultura mais sustentável e racional.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, nós detectamos seis compostos macho-específicos liberados por *M. v-luteum*, os sesquiterpenos (1*S,*4*R,*1'*S*)- e (1*R,*4*R,*1'*S*)-zingiberenol, (1**S,*4**S*)- e (1**R,*4**S*)-murgantiol e o sesquipiperitol, e que desempenharam um papel bifuncional como agregação e sexual. Realça-se a primeira vez que todos os compostos naturais identificados foram registrados sendo emitidos por machos de uma única espécie. Para *A. albopunctatus* marcou-se a liberação dos compostos macho-específicos emitidos significantemente na escotofase em laboratório, e que tiveram uma bioatividade marcada como feromônio sexual. Para *M. v-luteum* o estabelecimento da estereoquímica absoluta de algumas moléculas precisam ser finalizadas, e um completo entendimento da estereoquímica absoluta e a atividade biológica necessitam ser atingidos em respeito às totais estereoquímicas. O presente trabalho marcou o primeiro estudo dentro do gênero *Mormidea* como sendo a primeira evidencia do murgantiol para a tribo carpocorini, e para *Arvelius* a evidencia da bioatividade dos compostos macho-específicos e a dinâmica de produção, dos quais ainda sugerem serem produtos naturais inéditos para ciência.

7.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

I. Realizar a completa estereoquímica absoluta dos compostos macho-específicos de *Mormidea v-luteum*;

II. Averiguar a resposta dos compostos macho-específicos para ambas as espécies via eletroantenografia acoplada à cromatografia gasosa (EAG);

III. Implementar testes de campos empregando os compostos sintéticos de *Mormidea v-luteum*;

IV. Realizar mais bioensaios para aprofundar o entendimento da atratividade: sexual/agregação observada em laboratório;

V. Realizar a identificação dos compostos macho-específicos de *Arvelius albopunctatus*.

8. REFERÊNCIAS

AHMAD, I. et al. A revision of the sub-genus *Bagrada* Stal, 1862 (Heteroptera, Pentatomidae) from Pakistan with reference to zoogeography and phylogeny. **Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae**, v. 40, p. 377-397, 1981.

AGROFIT. **Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 16 de dez. 2020.

AIZEN, M. A. et al. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. **Annals of botany**, v. 103, n. 9, p. 1579-1588, 2009.

ALDRICH, J. R. et al. Identification of male-specific volatiles from Nearctic and Neotropical stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of chemical ecology**, v. 20, n. 5, p. 1103-1111, 1994.

ALDRICH, J. R. et al. Identification and attractiveness of a major pheromone component for Nearctic *Euschistus* spp. stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). **Environmental Entomology**, v. 20, n. 2, p. 477-483, 1991.

ALDRICH, J. R. et al. Pheromone strains of the cosmopolitan pest, *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Experimental Zoology**, v. 244, n. 1, p. 171-175, 1987.

ALDRICH, J. R. et al. Pentatomid natural products. **Journal of Chemical Ecology**, v. 4, n. 2, p. 161-172, 1978.

ALDRICH, J. R. et al. Pheromone blends of green stink bugs and possible parasitoid selection. **Naturwissenschaften**, v. 76, n. 4, p. 173-175, 1989.

BAKER, R. et al. Identification and synthesis of (*Z*)-(1′ *S*, 3′ *R*, 4′ *S*)(–)-2-(3′, 4′-epoxy-4′-methylcyclohexyl)-6-methylhepta-2, 5-diene, the sex pheromone of the southern

green stinkbug, *Nezara viridula* (L.). **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 6, p. 414-416, 1987.

BARBOSA, D. B. et al. As abelhas e seu serviço ecossistêmico de polinização. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 3, n. 4, p. 694-703, 2017.

BENTO, J. M. S. et al. How much is a pheromone worth?. **F1000Research**, v. 5, 2016.

BERGMANN, J. et al. Insect pheromone research in South America. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 7, p. 1206-1219, 2009.

BERGSTROM, G. Chemical ecology = Chemical + Ecology. **Pure Appl**. Chem, v. 79, n. 12, p. 2.305-2.323, 2007.

BIANCHI, F. M. et al. Total evidence phylogenetic analysis and reclassification of *Euschistus* Dallas within Carpocorini (Hemiptera: Pentatomidae: Pentatominae). **Systematic Entomology**, v. 42, n. 2, p. 399-409, 2017.

BORGES, M. et al. Behavioural evidence of methyl-2, 6, 10-trimethyltridecanoate as a sex pheromone of *Euschistus heros* (Het., Pentatomidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 122, n. 1-5, p. 335-338, 1998.

BORGES, M. et al. Pheromone sharing: blends based on the same compounds for *Euschistus heros* and *Piezodorus guildinii*. **Journal of chemical ecology**, v. 25, n. 3, p. 629-634, 1999.

BORGES, M. et al. Sex attractant pheromone from the rice stalk stink bug, *Tibraca limbativentris* Stal. **Journal of chemical ecology**, v. 32, n. 12, p. 2749, 2006.

BORGES, M. et al. A male-produced sex pheromone from the neotropical redbanded stink bug, *Piezodorus guildinii* (W.). **Journal of chemical ecology**, v. 33, n. 6, p.123 5, 2007.

BORGES, M. et al. Monitoring the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) with pheromone-baited traps in soybean fields. **Journal of Applied Entomology**, v. 135, n. 1-2, p. 68-80, 2011.

BOTTA, R. A. et al. Abundância sazonal de percevejo-do-colmo do arroz. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 4, p. 417-423, 2014.

BLUM, M. S. et al. n-Tridecane and trans-2-heptenal in scent gland of the rice stink bug *Oebalus pugnax* (F.). **Science**, v. 132, n. 3438, p. 1480-1481, 1960.

BLASSIOLI-MORAES, M. C. et al. Male-Produced Sex Pheromone of *Tibraca limbativentris* Revisited: Absolute Configurations of Zingiberenol Stereoisomers and their Influence on Chemotaxis Behavior of Conspecific Females. **Journal of Chemical Ecology**, v. 46, n. 1, p. 1-9, 2020.

BRAIBANTE, M. E. F; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. **Química nova na escola**, v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.

BRANDÃO, G. C. et al. Ciclo de vida do percevejo *Mormidea pictiventris* (Heteroptera: Pentatomidae) tendo o arroz como hospedeiro. In: **Embrapa Arroz e Feijão-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: Seminário Jovens Talentos, 12, 2018, Santo Antônio de Goiás. Resumos. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2018., 2018.

BRÉZOT, P. et al. Bisabolene epoxides in sex pheromone in *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae): Role of cis isomer and relation to specificity of pheromone. **Journal of chemical ecology**, v. 20, n. 12, p. 3133, 1994.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Análise mensal: Arroz. Maio/junho de 2020. Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-arroz. Acesso em: 15 de nov. 2020.

COKL, A.; BORGES, M. **Stinkbugs: Biorational Control Based on Communication Processes**. CRC press, p. 276, 2017.

COKL, A. et al. Tuning of host plants with vibratory songs of *Nezara viridula* L (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 8, p. 1481-1488, 2005.

COKL, A. Functional properties of vibroreceptors in the legs of. *Nezara viridula*, **J Comp Physiol**, p. 261-269, 1983.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Análise mensal: Tomate: Análise dos Indicadores da Produção e Comercialização no Mercado Mundial, Brasileiro e Catarinense. **Compêndio de estudos Conab**. ISSN: 2448-3710, v, 21, 2019.

COSTA, E. A. Distribuição espacial e preferência alimentar de *Tibraca limbativentris* stal (Hemiptera: Pentatomidae) na cultura do arroz e em vegetação nativa e espontânea na região norte maranhense. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia). Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís, 2013. Disponível em: http://45.71.6.36/bitstream/123456789/203/1/dissertao-elizabeth1.pdf. Acessado em: 20 de jan. 2021.

COSTA, M. L. M. et al. Biologia reprodutiva de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Anais da sociedade entomológica do Brasil**, v. 27, n. 4, p. 559-568, 1998.

COSTA-LIMA, **Insetos do Brasil - Hemípteros**. Escola Nacional de Agricultura, 2º Tomo. Capítulo XXII, pg. 352, 1940.

CHANG, Te-Tzu. Crop history and genetic conservation: rice—a case study. **Iowa State J. Res**, v. 59, n. 4, p. 425-455, 1985.

CHOWN, S. L.; TERBLANCHE, J. S. Physiological diversity in insects: ecological and evolutionary contexts. **Advances in insect physiology**, v. 33, p. 50-152, 2006.

DA SILVA, C. M.. K.; et al. Observações biológicas do estágio de ovo e adulto de *Mormidea notulifera* Stal, 1960 (Heteroptera, Pentatomidae). **Títulos não-correntes**, v. 4, n. 1, 1990.

DE CLERCQ, P. et al. Predation by *Podisus maculiventris* on different life stages of *Nezara viridula*. **Florida Entomologist**, v. 85, n. 1, p. 197-202, 2002.

DE BAPTISTA, G. C. et al. Resíduos agrotóxicos podem constituir barreira à exportação. 2007. Segurança: Monitoramento, visão agrícola. Disponível em: https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va07-seguranca07.pdf. Acesso: 12 de dez de 2020.

DESUTTER-GRANDCOLAS, L. A phylogenetic analysis of the evolution of the stridulatory apparatus in true crickets (Orthoptera, Grylloidea). **Cladistics**, v. 13, n. 1-2, p. 101-108, 1997.

EL-SAYED, A. M. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. Disponível em: <http://www.pherobase.com>. Acessado em: 10 de out. 2020.

DENT, D.; BINKS, R. H. **Insect pest management**. Cabi, 2020.

FAOSTAT, FAO et al. FAO statistical databases. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2018. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. Acesso em: 05 de out. 2020.

FÁVARO, C. F. et al. Identification of semiochemicals in adults and nymphs of the stink bug *Pallantia macunaima* Grazia (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 1, p. 58-64, 2011.

FÁVARO, C. F. et al. (6*R*,10*S*)-Pallantione: the first ketone identified as sex pheromone in stink bugs. **Organic letters**, v. 15, n. 8, p. 1822-1825, 2013.

FÁVARO, C. F.; ZARBIN, P. H. G. Identification of (Z)-4-and 1-tridecene in the metathoracic gland secretions of stink bugs employing the GC/FT-IR technique. **Journal of chemical ecology**, v. 39, n. 9, p. 1182-1185, 2013.

FÁVARO, C. F.; SANTOS, T. B.; ZARBIN, P. H. G. Defensive compounds and male-produced sex pheromone of the stink bug, *Agroecus griseus*. **Journal of chemical ecology**, v. 38, n. 9, p. 1124-1132, 2012.

FÁVARO, C. F. et al. Identification and synthesis of the male-produced sex pheromone of the stink bug, *Pellaea stictica*. **Journal of chemical ecology**, v. 41, n. 9, p. 859-868, 2015.

FERREIRA, E; BARRIGOSSI, J. A. F. Produção e qualidade do grão do arroz irrigado infestado por adultos de percevejo-das-panículas. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 41, n. 7, p. 1083-1091, 2006.

FERREIRA, J. A. M et al. Predatory behaviour of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) on different densities of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 7, p. 711-719, 2008.

FERREIRA, J. T. B.; ZARBIN, P. H. G. Amor ao primeiro Odor a comunicação química entre os insetos. **Química Nova na Escola**, v. 7, n. 2, p. 101-104, 1998.

FERREIRA, E.; DA SILVA MARTINS, J. F. **Insetos prejudiciais ao arroz no Brasil e seu controle**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAF, 1984.

FERREIRA, E. et al. Percevejos das panículas do arroz: fauna heteroptera associada ao arroz. **Embrapa Arroz e Feijão-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2001.

FINN, W. E. et al. Stridulatory apparatus and analysis of the acoustics of four species of the subfamily Lamiinae (Coleoptera: Cerambycidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 65, n. 3, p. 644-647, 1972.

FISH, J.; ALCOCK, J. behavior of *Chlorochroa ligata* (Say) and *Cosmopepla bimaculata* (Thomas),(Hemiptera: Pentatomidae). **Entomological news**, 1973.

FUNDERBURK, J. et al. Predation of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) in field peppers by *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). **Environmental Entomology**, v. 29, n. 2, p. 376-382, 2000.

FÜRSTENAU, B. B. J. et al. Comparative morphology of immature stages of four species of *Chinavia* (Hemiptera, Pentatomidae), with a key to the species of Rio Grande do Sul, Brazil. **ZooKeys**, n. 319, p. 59, 2013.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. 2002. Piracicaba, FEALQ, 920p.

GARBELOTTO, T. A.; CAMPOS, L. A. **Pentatominae do Sul de Santa Catarina**. Série Zoologia: guias e manuais de identificação/Sociedade Brasileira de Zoologia, ISBN 978-85-98203-08-9. Universidade Federal do Paraná. 80 pg. 2014.

GORDON, T. L. et al. Potential of three trap crops in managing *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) on tomatoes in Florida. **Journal of Economic Entomology**, v. 110, n. 6, p. 2478-2482, 2017.

GUARINO, S. et al. Role of volatile and contact pheromones in the mating behaviour of *Bagrada hilaris* (Heteroptera: Pentatomidae). **European Journal of Entomology**, v. 105, n. 4, p. 613, 2008.

GUNN, C. R.; GAFFNEY, F. B. **Seed characteristics of 42 economically important species of Solanaceae in the United States**. US Department of Agriculture, 1971.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Os insetos: um resumo de entomologia**. Roca, p. 480, 2012.

GREVE, C. et al. Estágios imaturos de *Oebalus poecilus* (Heteroptera, Pentatomidae). **Iheringia. Série Zoologia**, v. 93, n. 1, p. 89-96, 2003.

GRAZIA, J. et al. Stink bugs (Pentatomidae). In: **True bugs (Heteroptera) of the Neotropics**. Springer, Dordrecht. p. 681-756, 2015.

GRAZIA, J. et al. Morphology, ontogeny, reproduction, and feeding of true bugs. In: **True Bugs (Heteroptera) of the Neotropics**. Springer, Dordrecht, p. 21-55. 2015a.

GRAZIA, J.; FERNANDES, A. J. M. Subordem Heteroptera Linnaeus, 1758. in: RAFAEL, J. A.; IDE, S. Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. **Ribeirão Preto: Hollos editora, 720p**, 2012.

GRAZIA J. et al. Pentatomoidea. In: Brandão C, C. E (eds) Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. FAPESP, São Paulo, pp 101–112, 1999.

GRIMALDI, D.; ENGEL. M, S. **Evolution of the Insects**. Cambridge University Press, p 770. 2005.

GRÜTZMACHER, D. D. et al. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 6, p. 632-637, 2008.

HAN, W. et al. Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. **Chemosphere**, v. 192, p. 59-65, 2018.

HERMIDA, C. et al. Limites de resíduos de agrotóxicos e barreiras técnicas comerciais. **Agroalimentaria**, v. 21, n. 41, p. 151-170, 2015.

HICKEL, E. R. et al. Percevejos nas lavouras catarinenses de arroz irrigado: ocorrência, monitoramento e manejo integrado. **Florianópolis: Epagri. (Boletim, 173)**, 2016.

HO, H.; MILLAR, J. G. Identification and synthesis of male-produced sex pheromone components of the stink bugs *Chlorochroa ligata* and *Chlorochroa uhleri*. **Journal of chemical ecology**, v. 27, n. 10, p. 2067-2095, 2001.

HO, H.; MILLAR, J. G. Identification and synthesis of a male-produced sex pheromone from the stink bug *Chlorochroa sayi*. **Journal of chemical ecology**, v. 27, n. 6, p. 1177-1201, 2001a.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. LSPA - **Produção, por período da safra e produto** - Sidra – IBGE. Disponível em:<https://sidra.ibge.gov.br/ home /lspa/brasil>. Acessado em 15 de nov. 2020.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao -de-agrotoxicos. Acesso: 12 de dez de 2020.

INOUE, K. M. et al. Identificaton of the Alarm and Sex Pheromones of the Leaf-Footed Bug, *Leptoglossus zonatus* (Heteroptera: Coreidae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 5, p. 939-947, 2019.

ISHIWATARI, T. Studies on the scent of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae): II. Aggregation pheromone activity. **Applied Entomology and Zoology**, v. 11, n. 1, p. 38-44, 1976.

JAGATHEESWARI, D. Morphological studies on flowering plants (Solanaceae). **International Letters of Natural Sciences**, v. 10, 2014.

JAMES, D. G. et al. Flight-mediated attraction of *Biprorulus bibax* Breddin (Hemiptera: Pentatomidae) to natural and synthetic aggregation pheromone. **Journal of chemical ecology**, v. 20, n. 1, p. 71-80, 1994.

JERAM, S; ČOKL, A. Mechanoreceptors in insects: Johnston's organ in *Nezara viridula* (L.) (Pentatomidae, Heteroptera). **Pflügers Archiv**, v. 431, n. 6, p. R281-R282, 1996.

KARLSON, P.; LÜSCHER, M. Pheromone. **Naturwissenschaften**, v. 46, n. 2, p. 63-64, 1959.

KASTELEIN, P.; CAMARGO, E. P.; Trypanosomatid protozoa in fruit of solanaceae in southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 4, p. 413-417, 1990.

KAVČIČ, A. et al. Tremulatory and abdomen vibration signals enable communication through air in the stink bug Euschistus heros. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56503, 2013.

KESTER, K. M.; SMITH, C. M.; GILMAN, D. Frank. Mechanisms of resistance in soybean (Glycine max [L.] Merrill) genotype PI171444 to the southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Environmental entomology**, v. 13, n. 5, p. 1208-1215, 1984.

KOCH, R. L. et al. Identification, biology, impacts, and management of stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) of soybean and corn in the Midwestern United States. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 8, n. 1, 2017.

KHRIMIAN, A. et al. Discovery of the aggregation pheromone of the brown marmorated stink bug (Halyomorpha *halys*) through the creation of stereoisomeric libraries of 1-bisabolen-3-ols. **Journal of natural products**, v. 77, n. 7, p. 1708-1717, 2014a.

KHRIMIAN, A. et al. Determination of the stereochemistry of the aggregation pheromone of harlequin bug, *Murgantia histrionica*. **Journal of chemical ecology**, v. 40, n. 11-12, p. 1260-1268, 2014b.

KHRIMIAN, A. et al. Absolute configurations of zingiberenols isolated from Ginger (*Zingiber officinale*) rhizomes. **Journal of natural products**, v. 78, n. 12, p. 3071-3074, 2015.

KREISER, W.; KÖRNER, F. Stereospecific Synthesis of (+)-*β*-Sesquiphellandrene. **Helvetica chimica acta**, v. 82, n. 9, p. 1427-1433, 1999.

KRUPKE, C. H. et al. Field attraction of the stink bug *Euschistus conspersus* (Hemiptera: Pentatomidae) to synthetic pheromone-baited host plants. **Journal of economic entomology**, v. 94, n. 6, p. 1500-1505, 2001.

LANCASTER, J. et al. De novo formation of an aggregation pheromone precursor by an isoprenyl diphosphate synthase-related terpene synthase in the harlequin bug. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 37, p. 8634-8641, 2018.

LAUMANN, R. A. et al. Vibratory Communication and its relevance to reproductive isolation in two sympatric stink bug species (Hemiptera: Pentatomidae: Pentatominae). **Journal of insect behavior**, v. 29, n. 6, p. 643-665, 2016.

LEAL, W. S. Pheromone reception. In: **The chemistry of pheromones and other semiochemicals II**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 1-36. 2005.
LEAL, W. S. et al. Male-released sex pheromone of the stink bug *Piezodorus hybneri*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, n. 11, p. 1817-1829, 1998.

LYE, B.; STORY, R. N.; WRIGHT, Vernon L. Southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) damage to fresh market tomatoes. **Journal of economic entomology**, v. 81, n. 1, p. 189-194, 1988.

MARTINS, C. B. C. et al. Cuticular compounds recognition and mating behavior of the rice water weevil *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of insect behavior**, v. 26, n. 6, p. 812-823, 2013.

MARTÍNEZ, L. E.; FOLCIA, A. M. Aspectos morfológicos y biológicos de *Arvelius albopunctatus* (De Geer, 1773) (Hemíptera: Pentatomidae). **Boletín de sanidad vegetal, plagas**, v. 25, p. 13, 1999.

MATESCO, V. C. et al. Morfologia dos estágios imaturos e biologia de *Chinavia longicorialis* (Breddin) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 1, p. 74-82, 2009.

MEDRANO, E. G. et al. Transmission of cotton seed and boll rotting bacteria by the southern green stink bug (*Nezara viridula* L.). **Journal of applied microbiology**, v. 103, n. 2, p. 436-444, 2007.

MEN, H. C. Evidence of male-produced sex pheromone in the white spotted spined stink bug *Eysarcoris parvus* (Heteroptera: Pentatomidae). In: **First Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology**. 1999.

MORI, K. et al. Determination of the absolute configuration of the male aggregation pheromone, 2-methyl-6-(4′-methylenebicyclo [3.1. 0] hexyl) hept-2-en-1-ol, of the stink bug *Erysarcoris lewisi* (Distant) as 2*Z*, 6*R*, 1′ *S*, 5′ *S* by its synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 2, p. 354-357, 2008.

MORAES, M. C. B. et al. Sex attractant pheromone from the neotropical red-should ered stink bug, *Thyanta perditor* (F.). **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 6, p. 1415-1427, 2005.

MORAES, M. C. B. et al. The chemical volatiles (semiochemicals) produced by neotropical stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 489-505, 2008.

MORI, K. et al. Determination of the absolute configuration of the male aggregation pheromone, 2-methyl-6-(4′-methylenebicyclo [3.1. 0] hexyl) hept-2-en-1-ol, of the stink bug *Erysarcoris lewisi* (Distant) as 2*Z*, 6*R*, 1′ *S*, 5′ *S* by its synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 2, p. 354-357, 2008.

MCBRIEN, H. L. et al. Sex attractant pheromone of the red-shouldered stink bug *Thyanta pallidovirens*: a pheromone blend with multiple redundant components. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 9, p. 1797-1818, 2002.

MCBRIEN, H. L. et al. Comparison of substrate-borne vibrational signals of two congeneric stink bug species, *Thyanta pallidovirens* and *T*. *custator accerra* (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Insect Behavior**, v. 15, n. 6, p. 715-738, 2002b.

MCPHERSON, J. E.; AHMAD, I. Comparison of male genitalia of *Murgantia histrionica*, *M*. *varicolor*, and *M*. *violascens* (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v. 110, n. 4, p. 1028-1033, 2008.

MCPHERSON, J. E.; AHMAD, I. *Murgantia thomasi*, a new species of stink bug from the Dominican Republic (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, n. 2, p. 149-153, 2011.

MCPHERSON, J. E. **Invasive stink bugs and related species (Pentatomoidea): biology, higher systematics, semiochemistry, and management**. CRC Press, p. 840, 2017.

MCPHERSON, J. E. et al. *Murgantia histrionica* (Hahn). In: **Invasive Stink Bugs and Related Species (Pentatomoidea): Biology, Higher Systematics, Semiochemistry, and Management**. Crc Press, 2017a.

NIELSEN, A. L. et al., Developmental rate estimation and life table analysis for *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). **Environmental Entomology**, v. 37, n. 2, p. 348-355, 2008.

NOGE, K. et al. Defensive roles of (*E*)-2-alkenals and related compounds in Heteroptera. **Journal of chemical ecology**, v. 38, n. 8, p. 1050-1056, 2012.

OLIVEIRA, C. M. et al. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, v. 56, p. 50-54, 2014.

OLIVEIRA, M. W. M. et al. Zingiberenol, (1*S*, 4*R*, 1′*S*)-4-(1′, 5′-dimethylhex-4′-enyl)-1-methylcyclohex-2-en-1-ol, identified as the sex pheromone produced by males of the rice stink bug *Oebalus poecilus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 32, p. 7777-7785, 2013.

OLIVEIRA NETO, A. A. Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). A cultura do arroz. **Brasília: Conab**, v. 182, 2015.

OLIVER, J. E. et al. A male-produced pheromone of the spined citrus bug. **Tetrahedron letters**, v. 33, n. 7, p. 891-894, 1992.

PANIZZI, A. R. et al. Impacto da troca de alimento da fase ninfal para a fase adulta e do estresse nutricional na fase adulta na biologia de *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 24, n. 8, p. 945-954, 1989.

PANIZZI, A. R.; LUCINI, T. Host plant-stink bug (Pentatomidae) relationships. In: **Stinkbugs: Biorational Control Based on Communication Processes**, 2017.

PANIZZI, A. R.; GRAZIA, J. Introduction to true bugs (Heteroptera) of the neotropics. In: **True bugs (Heteroptera) of the neotropics**. Springer, Dordrecht, p. 3-20. 2015.

PANIZZI, A. R. Growing problems with stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): species invasive to the US and potential neotropical invaders. **American Entomologist**, v. 61, n. 4, p. 223-233, 2015.

PARRA, J. R. P. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Editora Manole^{Ltda}, 2002.

PEIFFER, M.; FELTON, G. W. Insights into the saliva of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e88483, 2014.

PELAEZ, V. et al. A dinâmica do comércio internacional de agrotóxicos. **Revista de Política Agrícola**, v. 25, n. 2, p. 39-52, 2016.

PIMENTEL, D.; PESHIN, R. **Integrated pest management: pesticide problems**. Springer Science & Business Media, vol. 3, p. 484. 2014.

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

PINTO-ZEVALLOS, Delia M. et al. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1395-1405, 2013.

PEDROTTI, A. et al. Sistemas de cultivo de arroz irrigado e a compactação de um Planossolo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 709-715, 2001.

POLAJNAR, J. et al. *Palomena prasina* (Hemiptera: Pentatomidae) vibratory signals and their tuning with plant substrates. **Open Life Sciences**, v. 8, n. 7, p. 670-680, 2013.

POSSEBOM, T. et al. Stink Bugs Nymph and Adult Biology and Adult Preference on Cultivated Crop Plants in the Southern Brazilian Neotropics. **Environmental Entomology**, v. 49, n. 1, p. 132-140, 2020.

PRATISSOLI, D; DE CARVALHO, J. R. Guia de Campo: pragas da cultura do tomateiro. **NUDEMAFI (Série técnica), Centro de Ciências Agrarias–UFES, Alegre, Brazil, 35p**, 2015.

PROGRAMA DE ANALISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS (PARA). **Relatório complementar relativo à segunda etapa de amostras coletadas em 2012**. Gerência-Geral de Toxicologia. Brasília, out. 2014.

RAFAEL, J. A; MARQUES M, D. Hexapoda. In: FRANSOZO, Adilson; NEGREIROS FRANSOZO, Maria Lucia. **Zoologia dos invertebrados**. GEN Roca, 2017.

RICE, K. B. et al. Biology, ecology, and management of brown marmorated stink bug (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Integrated Pest Management**, v. 5, n. 3, p. A1-A13, 2014.

RIDER, A. D. **Base de dados sobre Pentatomoidea**. North Dakota State Univeristy. Disponível em: https://www.ndsu.edu/pubweb/~rider/Pentatomoidea/Genus_Carpocorini /Dolycoris.htm. Acesso em: 16 de dez. de 2020.

RIDER, D. A.; ROLSTON, L. H. Review of the genus *Agroecus* Dallas, with the description of a new species (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of the New York Entomological Society**, p. 428-439, 1987.

RIDER, D. A.; CHAPIN, J. B. Revision of the genus *Thyanta* Stål, 1862 (Heteroptera: Pentatomidae) I. South America. **Journal of the New York Entomological Society**, p. 1-77, 1991.

RIDER, D. A.; CHAPIN, J. B. Revision of the genus *Thyanta* Stål, 1862 (Heteroptera: Pentatomidae) II. North America, Central America, and the West Indies. **Journal of the New York Entomological Society**, p. 42-98, 1992.

RODRIGUES, R. et al. Manejo de água em arroz de terras altas no sistema de plantio direto, usando o tanque classe A. **Engenharia Agrícola**, v. 24, n. 3, p. 546-556, 2004.

ROSADO-NETO, G. H.; SANTOS, G. B. The elytro-tergal stridulatory apparatus of the genus *Bondarius* Rosado-Neto (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, n. 2, p. 337-338, 2010.

ROLSTON, L. H. A revision of the genus *Mormidea* (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of the New York Entomological Society**, p. 161-219, 1978.

ROZA-GOMES, M. F. et al. Injúrias de quatro espécies de percevejos pentatomídeos em plântulas de milho. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1115-1119, 2011.

SANTOS, G. R. Características, sistema de registros de produtos e concorrência no mercado de agrotóxicos no Brasil. **IPEA - Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**. n. 20. P. 7. 2012.

SAULICH, A. K. H; MUSOLIN, D. L. Seasonal cycles in stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae) from the temperate zone: diversity and control. **Entomological Review**, v. 94, n. 6, p. 785-814, 2014.

SILVA, C. et al. Comparative biology of two congeneric stinkbugs, *Chinavia impicticornis* and *C. ubica* (Hemiptera: Pentatomidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 5, p. 355-362, 2015.

SILVA, E. J. E.; FERNANDES, J. A. M.; GRAZIA, J. Morphological variants in *Edessa rufomarginata* and revalidation of *E. albomarginata* and *E. marginalis* (Heteroptera, Pentatomidae, Edessinae). **Iheringia. Série Zoologia**, v. 94, n. 3, p. 261-268, 2004.

SOMAVILLA, J. C. et al. Susceptibility of Euschistus heros and Dichelops furcatus (Hemiptera: Pentatomidae) to insecticides determined from topical bioassays and diagnostic doses for resistance monitoring of E. heros in Brazil. **Crop Protection**, v. 138, p. 105319, 2020.

SOSA-GÓMEZ, D. R. et al. Prevalence, damage, management and insecticide resistance of stink bug populations (Hemiptera: Pentatomidae) in commodity crops. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 22, n. 2, p. 99-118, 2020.

SUGIE, H. et al. Identification of the aggregation pheromone of the brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott (Heteroptera: Pentatomidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 31, n. 3, p. 427-431, 1996.

SCHWERTNER, C. F. et al. Descrição dos estágios imaturos de *Acrosternum* (*Chinavia*) *ubicum* Rolston (Heteroptera: Pentatomidae) e efeito do alimento no tamanho e coloração das ninfas. **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 4, p. 571-579, 2002.

SCHWERTNER, C. F.; GRAZIA, J. O gênero *Chinavia* Orian (Hemiptera, Pentatomidae, Pentatominae) no Brasil, com chave pictórica para os adultos. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 51, n. 4, p. 416-435, 2007.

SCHAEFER, C. W.; PANIZZI, A. R. **Heteroptera of economic importance**. Boca Raton. CRC Press, p. 852, 2000.

SHARMA, S. D. **Rice: origin, antiquity and history**. CRC Press, 580 p. 2010.

STOPPELLI, I. M. S. et al. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, p. 91-100, 2005.

SZWEDO, J. The unity, diversity and conformity of bugs (Hemiptera) through time. **Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh**, v. 107, n. 2-3, p. 109-128, 2018.

TAKANASHI, T. et al. Vibrations in hemipteran and coleopteran insects: behaviors and application in pest management. **Applied entomology and zoology**, v. 54, n. 1, p. 21-29, 2019.

TAKITA, M. et al. Isolation and estimation of the aggregation pheromone from *Eysarcoris lewisi* (Distant) (Heteroptera: Pentatomidae). **Applied entomology and zoology**, v. 43, n. 1, p. 11-17, 2008.

TILLMAN, P. G. et al. Pheromone attraction and cross-attraction of *Nezara*, *Acrosternum*, and *Euschistus* spp. stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) in the field. **Environmental Entomology**, v. 39, n. 2, p. 610-617, 2010.

VECCHIO, M. C. et al. Dimorfismo sazonal em *Oebalus ypsilongriseus* (De Geer, 1773) (Hemiptera, Pentatomidae) e uma nova sinonímia. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 38, p. 101-108, 1994.

VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. Feromônios de insetos. **Viçosa, Impr. Univ., 155p**, 1987.

VILELA, E. F. Adoção de feromônios no manejo integrado de pragas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 23, p. 313-318, 1992.

VILELA E; DELLA LUCIA T. **Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação**. 2 ed. Ribeirão Preto: Holos. 206 p. 2001.

VIRANT-DOBERLET, M.; COKL, A. Vibrational communication in insects. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 2, p. 121-134, 2004.

YANG, C. et al. Male-Produced Aggregation Pheromone of the Sloe Bug, *Dolycoris baccarum* L. (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 45, n. 10, p. 818-822, 2019.

WANG, H. B. et al. Acoustic signals of *Dendroctonus valens* and structure of its stridulatory apparatus. **Forest Research, Beijing**, v. 25, n. 1, p. 17-22, 2012.

WITZGALL, P. et al. Sex pheromones and their impact on pest management. **Journal of chemical ecology**, v. 36, n. 1, p. 80-100, 2010.

WOOD, I.; MCDONALD, F. J. D. Revision of the Australian *Eysarcoris* group (Hemiptera: Pentatomidae). **Australian Journal of Entomology**, v. 23, n. 4, p. 253-264, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZ ATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Disponível em: https://www.who.int/en/ n ews-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food. Accesso em 20 de out. 2020.

ZAHN, D. K. et al. Identification, synthesis, and bioassay of a male-specific aggregation pheromone from the harlequin bug, *Murgantia histrionica*. **Journal of chemical ecology**, v. 34, n. 2, p. 238-251, 2008.

ZARBIN, P. H. G. et al. Metodologias gerais emprega das no isolamento e identifição estrutural de feromonios de insetos. **Quimica Nova**, v. 22, n. 2, p. 263–268, 1999.

ZARBIN, P. H. G. et al. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 722-731, 2009.

ZARBIN, P. HG et al. Male-produced sex pheromone of the stink bug *Edessa meditabunda*. **Journal of chemical ecology**, v. 38, n. 7, p. 825-835, 2012.

ZARBIN, P. HG et al. Alarm pheromone system of stink bug *Piezodorus guildinii* (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 4, p. 424-428, 2000.

ZARBIN, P. H. G. et al. Insect pheromone synthesis in Brazil: an overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 6, p. 1100-1124, 2007.

ŽUNIČ, A. et al. Communication with signals produced by abdominal vibration, tremulation, and percussion in *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 101, n. 6, p. 1169-1178, 2008.