



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ANALÚ CAMPOS REIS

**IDENTIFICAÇÃO DOS SEMIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA COMUNICAÇÃO
DO BESOURO *RHINOSTOMUS BARBIROSTRIS* (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE)**

Ilhéus

2017

ANALÚ CAMPOS REIS

**IDENTIFICAÇÃO DOS SEMIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA COMUNICAÇÃO
DO BESOURO *RHINOSTOMUS BARBIROSTRIS* (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, como requisito para obtenção do título Mestre em Química. Área de concentração: Recursos Naturais e Tecnologia; Linha de Pesquisa: Química de Produtos Naturais

Orientadora: Prof. Dr^a. Carla Fernanda Fávoro

**Ilhéus
2017**

R375 Reis, Analú Campos.
Identificação dos semioquímicos envolvidos na comunicação do besouro rhinostomus barbirostris (coleóptera : curculionidae) / Analú Campos Reis. - Ilhéus : UESC, 2017.
76f. : il.
Orientadora : Carla Fernanda Fávaro.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Química.
Inclui referências.

1. Pragas agrícolas – Controle biológico. 2. Insetos - Atração sexual. 3. Dendzeiros – Doenças e pragas. 4. Coqueiros – Doenças e pragas. 5. Besouro. 6. Feromônios. I. Fávaro, Carla Fernanda. II. Título.

CDD – 595.76

ANALÚ CAMPOS REIS

IDENTIFICAÇÃO DOS SEMIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA
COMUNICAÇÃO DO BESOIRO *Rhinostomus barbirostris*
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

Ilhéus-BA, 15 de fevereiro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA:



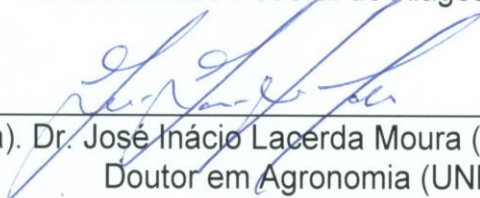
Prof(a). Dra. Carla Fernanda Fávoro
Doutora em Química - UFPR
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC
Orientador(a)



Prof(a). Dra. Rosilene Aparecida de Oliveira (UESC)
Doutora em Química - UFMG
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC



Prof(a). Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana (UFAL)
Doutor em Química - UFMG
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof(a). Dr. José Inácio Lacerda Moura (CEPLAC/CEPEC)
Doutor em Agronomia (UNESP)
CEPLAC/CEPEC

À minha família que, com muito amor, apoio e confiança, não mediu esforços para que eu cumprisse mais esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela dádiva da vida e por me abençoar grandiosamente a cada dia.

Aos meus pais Vera e Diney e minha avó Antonieta, por acreditarem em mim mais do que eu mesma.

Ao curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Santa Cruz e à Capes, pela oportunidade do curso.

A minha orientadora, Profa. Dra. Carla Fávaro, pela orientação, pela amizade, pelo apoio e por contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores que avaliaram este trabalho, Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart de Sant'Ana (UFAL) e a Profa. Dra. Rosilene Aparecida de Oliveira (UESC).

Ao pesquisador José Inácio (CEPLAC) pelos esforços e conhecimentos transmitidos para a realização deste trabalho e também pela avaliação deste trabalho.

Aos professores Paulo Zarbin, Maria Aparecida, Ivon Pinheiro, Rosenira Serpa, Raildo Mota, Marcelo Franco e Diogo Vidal, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de mestrados, pela convivência, apoio e carinho, em especial Iago e Erivelton pela amizade que levarei para a vida toda.

Às alunas de iniciação científica Palmira e Jéssica que me ajudaram nessa jornada.

Aos meus amigos, em especial Francine, Gilvan, Desdielle, Maeve e Edson, pela força, compreensão e incentivo.

Ao meu namorado, pela compreensão e apoio emocional.

A todos os meus familiares que sempre torceram pelo meu sucesso.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O besouro *Rhinostomus barbirostris* (Coleoptera: Curculionidae), conhecido também como broca-do-estipe-do-coqueiro, é uma praga que ataca coqueiros e dendezeiros. Não há inseticida certificado para o controle do *R. barbirostris*, até o momento, o único método de controle desta praga é a derrubada da planta infectada. A necessidade de métodos que sejam eficientes e não agridam o meio ambiente levam os semioquímicos a ser uma técnica bastante promissora no manejo integrado de *R. barbirostris*. Atualmente, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas sobre o uso dos semioquímicos como forma de controle de pragas, nas quais se usa armadilhas contendo feromônios sintéticos que tem a função de atraí-los ou confundi-los. Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa foi a elucidação estrutural e síntese dos semioquímicos responsáveis pela atração do *R. barbirostris*. Pela comparação dos cromatogramas dos extratos de voláteis liberados por machos e fêmeas obtidos através das análises por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC), foram observados dois compostos macho-específicos que tiveram suas estruturas elucidadas através das técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (CG-IVTF). As estruturas químicas dos compostos foram propostas como diastereoisômeros da 5-hidroxi-4-metil-hepta-3-ona, também conhecido como Sitophinona, que já foi identificada como feromônio de outras espécies da mesma subfamília de *R. barbirostris*. Após a síntese racêmica da proposta estrutural, foi realizada a caracterização do composto sintético através das análises por CG-EM e CG-IVTF no qual foram obtidos espectros semelhantes ao composto natural. Na coinjeção do composto natural com o padrão sintético houve coeluição, confirmando assim que se tratava do mesmo composto.

Palavras-chave: Controle de pragas, feromônios, coqueiro.

ABSTRACT

The beetle *Rhinostomus barbirostris* (Coleoptera: Curculionidae), also known as a coconut-tree-borer, is a pest that attacks coconut and palm trees. There are no insecticides certified for the control of *R. barbirostris*, so far, the only method of controlling this pest is to clear the infected plant. The need for methods that are efficient and non-environmentally friendly lead the semiochemicals to be a very promising technique in the integrated management of *R. barbirostris*. Currently, much research is being done on the use of semiochemicals as a form of pest control, in which traps containing synthetic pheromones are used to attract or confuse them. Thus, the objective of this research was the structural elucidation and synthesis of semiochemicals responsible for the attraction of *R. barbirostris*. By comparing the chromatograms of the extracts of volatiles released by males and females obtained by the analysis by gas chromatography with flame ionization detector (CG-FID), two male-specific compounds were observed that had their structures elucidated by gas chromatography techniques coupled to mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography coupled to Fourier transform infrared spectroscopy (CG-FTIR). The chemical structures of the compounds were proposed as diastereoisomers of 5-hydroxy-4-methylhepta-3-one, also known as Sitophinone, which has already been identified as pheromone of other species of the same subfamily of *R. barbirostris*. After the racemic synthesis of the structural proposal, the characterization of the synthetic compound was performed through the GC-MS and CG-IVTF analyzes in which spectra similar to the natural compound were obtained. The co-occurrence of the natural compound with the synthetic standard was coelution, thus confirming that it was the same compound.

Keywords: Pest control, pheromones, coconut.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	09
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. OBJETIVO GERAL.....	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1. SEMIOQUÍMICOS E SEU ENVOLVIMENTO NO CONTROLE DE PRAGAS.....	16
3.2. SEMIOQUÍMICOS NA COCOICULTURA	28
3.3. FAMÍLIA CURCULONIDAE E SEUS FEROMÔNIOS IDENTIFICADOS.....	30
4. METODOLOGIA.....	34
4.1. CRIAÇÃO DOS INSETOS.....	34
4.2. COLETA DE VOLÁTEIS.....	35
4.3. ANÁLISES QUÍMICAS DOS EXTRATOS.....	36
4.4. ÍNDICE DE KOVATS	37
4.5. BIOENSAIOS EM LABORATÓRIO.....	37
4.6. SÍNTESE DO FEROMÔNIO	39
4.6.1. SÍNTESE DA N-CICLOHEXIL-3-PENTAIMINA.....	39
4.6.2. SÍNTESE DA 5-HIDROX-4-METIL-3-HEPTANONA.....	39
4.7. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO COMPOSTO SINTÉTICO.....	40
4.8. TESTE DE CAMPO	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Adultos machos (A) e fêmeas (B) do <i>R. barbirostris</i>	12
Figura 2. Ataque do <i>R. barbirostris</i> no estipe de coqueiro.....	13
Figura 3. <i>Mastophora</i> e sua bola de seda utilizada para a captura de insetos	17
Figura 4. Vespa parasitóide <i>Cardiochiles nigriceps</i> e lagarta do tabaco, <i>Heliiothis virescens</i>	18
Figura 5. Sistema de defesa do milho quando atacado pela lagarta <i>Spodoptera exigua</i>	19
Figura 6. <i>Bombyx mori</i> e seu feromônio identificado (10E,12Z)- hexadecadien-1-ol.....	22
Figura 7. Exo-7-Etil-5-metil-6,8-dioxabicyclo[3.2.1] octano (Exo-brevicomina) feromônio de agregação de <i>Dendroctonus brevicomis</i>	22
Figura 8. Enantiômeros R e S do sulcatol	23
Figura 9. Exemplo de armadilha para o monitoramento de pragas	25
Figura 10. Exemplo de armadilha para confusão sexual	26
Figura 11. Exemplo de armadilha para coleta massal	27
Figura 12. Estrutura química do ((S, E)-6-metil-2-hepten-4-ol), conhecido como Rincoforol.....	29
Figura 13. Feromônios identificados para a subfamília Dryophthorinae	32
Figura 14. Modo de captura e criação do <i>Rhinostomus barbirostris</i>	34
Figura 15. Método para identificação de machos e fêmeas da espécie <i>Rhinostomus barbirostris</i> através da diferenciação do rostro.....	35
Figura 16. Sistema de aeração para coleta de voláteis	36
Figura 17. Ilustração de bioensaios em arena	38
Figura 18. Armadilhas utilizadas para a captura do <i>R. barbirostris</i> , A armadilha tipo balde e B armadilha tipo tubo PVC.....	41
Figura 19. Comparação do cromatogramas obtidos das análises dos voláteis liberados por machos e fêmeas de <i>Rhinostomus barbirostris</i> pela técnica CG-DIC, mostrando o composto macho-específico	43

Figura 20. Espectro de infravermelho do composto macho-específico majoritário (B) da espécie <i>Rhinostomus barbirostris</i>	46
Figura 21. Espectro de massas do composto macho-específico majoritário (B) produzido por <i>Rhinostomus barbirostris</i>	47
Figura 22. Rearranjo de McLafferty resultando no fragmento m/z 86	47
Figura 23. Estrutura química proposta para os compostos macho-específicos produzidos por <i>R. barbirostris</i>	48
Figura 24. Espectro de massas do composto <i>N</i> -ciclohexil-3-pentaimina	50
Figura 25. Espectro de infravermelho do composto <i>N</i> -ciclohexil-3-pentaimina.....	51
Figura 26. Espectro de RMN de ^1H da <i>N</i> -ciclohexil-3-pentaimina	52
Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C da <i>N</i> -ciclohexil-3-pentaimina.....	53
Figura 28. Espectro de RMN de DEPT 135 da <i>N</i> -ciclohexil-3-pentaimina	54
Figura 29. Espectro de massas do sintético da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona 1A e 1B.....	56
Figura 30. Espectro de infravermelho da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona 1A e 1B.....	57
Figura 31. Espectro de RMN de ^1H da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona racêmica.....	58
Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona racêmica.....	59
Figura 33 Espectros de massas do composto macho-específico majoritário B produzido pelo <i>R. barbirostris</i> e da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona 1B.....	61
Figura 34. Espectros de infravermelho do composto macho específico majoritário B produzido pelo <i>R. barbirostris</i> e da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona 1B.....	62
Figura 35. Comparação entre o tempo de retenção dos sintéticos com os compostos produzidos por <i>R. barbirostris</i>	63

1. INTRODUÇÃO

O coqueiro (*Cocos nucifera*) é uma frutífera típica de clima tropical e subtropical, sendo difundida mundialmente. Atualmente plantações de coqueiro são encontrados em mais de 200 países, espalhados em praticamente todos os continentes (EMBRAPA, 2011). A maioria dos países que cultivam essa planta, utilizam os frutos comercialmente para a produção de óleo e coco seco desidratado. No Brasil, os frutos do coqueiro são destinados principalmente à agroindústria, para a produção de coco ralado, leite de coco e o consumo da água de coco *in natura* (EMBRAPA, 2014).

Cultura típica de clima tropical, no Brasil a produção de coco se desenvolve ao longo do litoral, se estendo do Pará ao Espírito Santo. A região nordeste é a maior produtora de coco, sendo a Bahia, o Ceará e Sergipe os três estados nordestinos que mais contribuem para a produção no país. Por haver produção de coco durante todo o ano e o fato dele ser comercializado, tanto seco quanto verde, a cultura do coco assume posição de destaque como atividade geradora de emprego e renda, empregando mão de obra tanto no campo quanto nas indústrias. O coco também é muito utilizado na parte de artesanato gerando renda para os pequenos comerciantes e artesãos (FONTENELE, 2005; FONTES e WANDERLEY, 2006).

A incidência de pragas nos coqueirais é a maior responsável pela redução da produtividade de coco, sendo o besouro *Rhinostomus barbirostris* (Coleoptera: Curculionidae) uma das mais importantes, conhecida também como broca-de-estipe, broca-do-tronco ou Rhina. No Brasil, o *R. barbirostris* tem ocorrência nos estados do Amazonas, Bahia, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Sul, Sergipe e São Paulo (FERREIRA et al, 2016). Na Bahia, o *R. barbirostris* é o maior responsável pela disseminação da Resinose do Coqueiro e Dendenzeiro, doença causada pelo fungo *Ceratocystis paradoxa* e anel vermelho em coqueiros e dedenzeiros no sul da Bahia (SANTOS, 2016).

O besouro adulto de *R. barbirostris* é de coloração preta, cujo comprimento varia entre 1,5 e 5,0 cm. O macho diferencia-se da fêmea por apresentar denso pelos de coloração avermelhada ao redor do rostro; corpo cilíndrico, pronoto tão longo quanto largo e densamente pontuado (figura 1) (MOURA, dados ainda não publicados). A larva é ápoda, possuindo um corpo cilíndrico, com os últimos quatro segmentos do abdômen atrofiados (FERREIRA e FILHO, 2015).

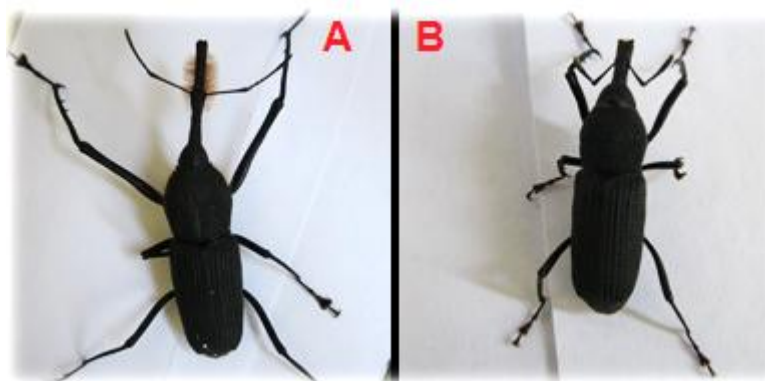


Figura 1. Adulto macho (A) e fêmea (B) do *R. barbirostris*. Foto: Carla Fávaro

O *R. barbirostris* possui hábitos noturnos, durante o dia fica alojado nas axilas foliares e a noite caminha pelo estipe onde a fêmea deposita seus ovos normalmente na base e no topo (MOURA, dados ainda não publicados). Quando a larva nasce, penetra no estipe formando galerias que se alarga à medida que ela se desenvolve. Nota-se a infestação do coqueiro pela praga através do aparecimento de pequenos filetes de serragem, que são expulsos do orifício que a larva entrou e o aparecimento de manchas pelo estipe, provadas pelo escorrimento da seiva (FERREIRA, 1987). A figura 2 mostra o coqueiro e a estipe após o ataque do *R. barbirostris*.

Ainda não há um método de controle eficiente para essa praga. Ao se detectar uma planta infectada a melhor maneira para o controle é a derrubada e queimada desta (FERREIRA, 1987). Para o controle químico é realizado pulverizações com inseticidas nas axilas foliculares do coqueiro com o intuito de atingir os adultos de *R. barbirostris*, quando em forma de larvas o controle via pulverizações convencionais não é eficiente em razão destas se alojarem dentro

do estipe (MOURA, dados ainda não publicados). Embora ocorre o controle químico com inseticidas, ainda não há inseticida registrado para o controle do *R. barbirostris*.



Figura 2. Ataque do *R. barbirostris* nas folhas e estipe de coqueiro. Foto: José Inácio Moura Lacerda

O uso de semioquímicos, principalmente os feromônios sintéticos, têm-se mostrado bastante eficiente para o controle de importantes pragas da família Curculionidae, como *Anthonomus grandis* e *Rhynchophorus palmarum*. O uso de feromônios para monitoramento desses insetos facilita a determinação da dinâmica populacional, auxiliando a tomada de decisão do agricultor no manejo dos insetos. O controle de curculionídeos utilizando feromônios tem sido feito principalmente por meio de coleta massal e com grande sucesso, uma vez que os feromônios desta família atraem ambos os sexos (BOARETTO e BRANDÃO, 2000).

A manipulação de populações com semioquímicos é um método em evidência no manejo de pragas. Em particular, a utilização de feromônios sintéticos é conhecida como uma técnica ambientalmente benigna de controle de

pragas que permite o controle da espécie alvo e redução na utilização de pesticidas (ZARBIN e CORREIA, 1998).

Embora *R. barbirostris* seja uma importante praga da cocoicultura brasileira, até o momento não há estudos sobre os semioquímicos envolvidos na comunicação desta espécie. Sendo assim, o uso de armadilhas contendo isca com os compostos químicos produzidos pelo *R. barbirostris* que são responsáveis pela atratividade dos seus coespecíficos (semioquímicos), seria um método alternativo de controle biorracional e eficaz.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Extrair, elucidar as estruturas químicas e sintetizar os semioquímicos responsáveis pela atração do *Rhinostomus barbirostris*, visando desenvolver armadilhas para o controle dessa praga.

2.2. Objetivos específicos

- 1- Coletar os insetos em campo e conduzir uma criação em laboratório;
- 2- Coletar os compostos voláteis produzidos por *R. barbirostris* machos e fêmeas virgens, através do método de aeração;
- 3- Verificar a atratividade dos extratos dos voláteis através de bioensaios em laboratório;
- 4- Selecionar o(s) composto(s) de interesse presentes no extrato, através de análises por CG-DIC;
- 5- Elucidar a(s) estrutura(s) química(s) do(s) composto(s) de interesse através de análises dos extratos por CG-EM e CG-IVTF;
- 6- Sintetizar as estruturas químicas propostas;
- 7- Testar a eficiência do feromônio sintético como iscas para armadilhas em campo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Semioquímicos e seu envolvimento no controle de pragas

Com o crescimento acelerado da população mundial, surgiu a necessidade de produção de alimentos em larga escala e, devido ao aumento desta demanda, houve também o aumento da briga da agricultura com os insetos. Segundo Goulart et al (2015), um inseto se torna praga agrícola a partir do momento que sua população cresce sem limites e esse crescimento está relacionado a fatores como oferta de alimentos, alta taxa reprodutiva e ausência de inimigos.

Os insetos pragas são as principais causas para a diminuição da produtividade de culturas alimentícias no Brasil, causando uma perda anual a 7,7 % o que equivale a aproximadamente 25 milhões de toneladas de alimentos por ano (GOULART et al, 2015). Por conta disso, os produtores intensificaram o combate dessas pragas com o uso de pesticidas não só no momento de ataque, mas também no uso de pulverizações como prevenção e como consequência houve um aumento no mercado, alimentos contaminados por estes.

O uso de pesticidas e agrotóxicos nas plantações ao longo dos últimos anos tornou-se a principal estratégia para o combate de pragas na lavoura (PINTO-ZEVALHOS e ZARBIN, 2013). Entretanto, o uso contínuo dessas substâncias acarreta danos à saúde humana e ao meio ambiente, a curto e longo prazo. Com a evidência de que essas substâncias são prejudiciais houve a necessidade de buscar novas alternativas que pudessem suprir as necessidades de controle das pragas e ao mesmo tempo que não colocassem em risco a saúde humana e o meio ambiente.

Um método alternativo para manejo de pragas é a utilização de semioquímicos. Os semioquímicos são compostos químicos responsáveis pelas interações dos seres vivos e podem ser usados em armadilhas para atrair, confundir ou repelir os insetos da lavoura (MORAES et al, 2013; ZARBIN, RODRIGUES e LIMA, 2009). Os semioquímicos são classificados com base no

tipo de interação, se intraespecífica ou interespecífica, e com base nos custos e benefícios de cada organismo participante da interação.

Os aleloquímicos são os semioquímicos que intermediam comportamentos de indivíduos de espécies diferentes, relação denominada de interespecífica. Nas plantas esses semioquímicos, na maioria das vezes estão relacionados a defesa e apresentam como substâncias do metabolismo secundário (SILVA et al, 2012). Estes, tem grande importância na relação inseto-planta pois traduzem o comportamento e a relação de organismos de espécies diferentes (LIMA et al, 2013). Os aleloquímicos exercem papel fundamental em todas as comunidades e podem ser divididos em três classes:

Alomônios (+/-) são os semioquímicos que favorecem o organismo emissor, mas não o receptor. Como o caso das aranhas-bolas do gênero *Mastophora* (Figura 3), que utilizam alomônios semelhantes ao feromônio sexual das fêmeas de duas espécies de Noctuíde, e com isso conseguem atrair machos destas espécies, capturando-os com uma bola de seda pegajosa (VILELA e LÚCIA, 2001).



Figura 3. *Mastophora* e sua bola de seda utilizada para a captura de insetos (Fonte: Google imagens).

Cairomônios (-/+) são os semioquímicos que favorecem o organismo receptor, mas não o emissor. Como exemplo temos a vespa parasitóide *Cardiochiles nigriceps* que responde aos hidrocarbonetos produzidos pelas

glândulas mandibulares da *Heliiothis virescens*, lagarta que se alimenta de folhas de maçãs e tabaco (Figura 4) (VILELA e LÚCIA, 2001).



Figura 4. Vespa parasitoide *Cardiochiles nigriceps* e lagarta do tabaco, *Heliiothis virescens* (Fonte: Google imagens).

Sinônimos (+/+) são os semioquímicos que favorecem o organismo emissor e o receptor, esse tipo de alomônios intermediam as interações planta-herbívoro e herbívoro-predador. Um exemplo muito comum é quando a planta está sendo atacada e começa a liberar voláteis que atraem os predadores do herbívoro. Como exemplo, o milho *Zea mays* quando é atacado pela lagarta *Spodoptera exigua* emite uma mistura de voláteis constituídos por indol, mono e sesquiterpenos, que atraem as fêmeas do parasitoide *Cotesia marginiventris* (PINTO et al, 2002). Quando a secreção oral da lagarta entra em contato com o tecido ferido da planta, ela induz a produção de jasmonatos, que induzem a codificação de enzimas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários do sistema defensivo da planta que atraem a vespa predadora. Esse esquema de defesa pode ser visto na figura a seguir (PINTO et al, 2002):

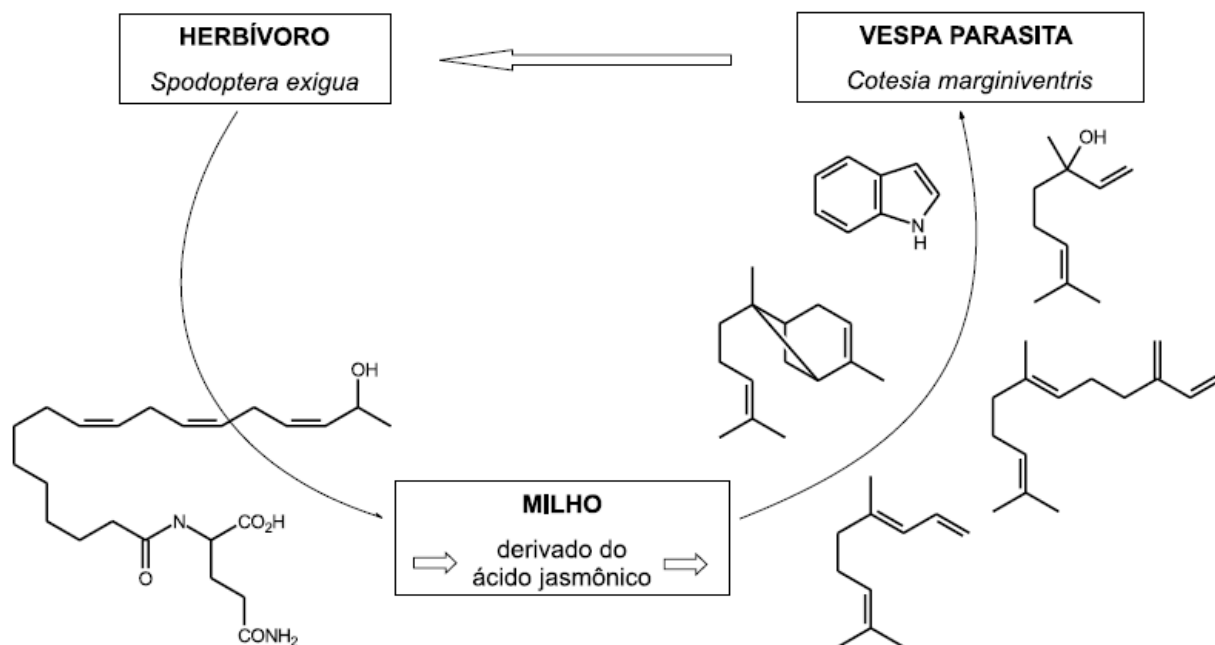


Figura 5. Sistema de defesa do milho quando atacado pela lagarta *Spodoptera exigua*. Fonte: PINTO et al, 2002.

Dentre os semioquímicos, existem também os feromônios, que são substâncias químicas responsáveis pela comunicação de indivíduos de mesma espécie (NAVARRO et al, 2002). Segundo Vilela e Lucia (2001), feromônios são compostos secretados por um indivíduo para o meio e recebidos por outros indivíduos de mesma espécie provocando uma resposta fisiológica. Para os insetos, os feromônios podem ser classificados como:

Feromônio sexual: empregado no acasalamento, normalmente apenas o macho ou a fêmea o produz, atraindo apenas o sexo oposto (NAVARRO et al, 2002).

Feromônio de trilha: empregado para indicar a fonte de alimento ou orientar os insetos para sua moradia (NAVARRO et al, 2002).

Feromônio de território ou marcação: utilizado para delimitar territórios (NAVARRO et al, 2002).

Feromônio de alarme: sinaliza perigo ou presença de inimigos (NAVARRO et al, 2002).

Feromônio de agregação: empregado para atrair indivíduos da mesma espécie para alimentação ou acasalamento, atraindo os dois sexos (NAVARRO et al, 2002).

Além desses citados acima há também outros tipos de feromônios, como o feromônio de contato utilizado para o reconhecimento da espécie, feromônio de oviposição utilizado pela fêmea para indicar o local de oviposição e assim impedir que outra fêmea de sua espécie deposite no mesmo local, ente outros (VILELA e LUCIA, 2001).

O feromônio é produzido apenas por um sexo e reconhecido por indivíduos de uma mesma espécie, podendo o mesmo composto em proporções diferentes ser produzido por duas espécies. As antenas são os órgãos receptores dos feromônios nos insetos, estas são órgãos que capta e transmite estímulos mecânicos e olfativos, podendo discriminar uma mudança na concentração de compostos, na isomeria e na composição. Através desse princípio, foi desenvolvida a técnica de cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia (CG-EAD), a qual utiliza a antena do inseto como biossensor para compostos bioativos. Para isso, a antena é colocada em um eletrodo e o circuito é fechado com uma solução salina, quando a antena reconhece um composto há uma despolarização da antena seguida de polarização gerando assim um sinal no detector (MORAES et al, 2008).

O local de produção dos feromônios varia entre as espécies, como nas mariposas, moscas e baratas, em que a glândula que produz o feromônio se encontra localizada nas células epidérmicas. Já nos coleópteros, o local da biossíntese é variada, mas normalmente as glândulas produtores se encontram no abdômen, sendo a produção de feromônios sexuais normalmente realizadas na epiderme do abdômen e feromônios monoterpénóides são produzidos no intestino médio (JURENKA, 2004).

A volatilidade do composto é um fator que pode determinar o tipo de feromônio que determinado inseto produz. Por exemplo, os feromônios de

contatos são constituídos principalmente de estruturas moleculares com cadeias mais longas, pois não necessitam de alta volatilidade (JURENKA, 2004). Já os feromônios de alarme devem ter baixo peso molecular, sendo altamente volátil, para que estes consigam alcançar seus receptores rapidamente. Os feromônios de trilha possuem estruturas moleculares estáveis e pouco voláteis de forma que se mantenha no ambiente para que os insetos possam se orientar (TORRENS, 2015).

Em uma mesma família há um padrão das estruturas moleculares, a maioria dos feromônios sexuais de mariposas são compostos de cadeia linear constituídos por 12, 14 e 16 átomos de carbono e um grupo funcional como álcool, aldeído e acetatos. Muitos feromônios de moscas também são hidrocarbonetos de 21 ou mais átomos de carbonos. Já os feromônios de coleópteros são de origem isoprenoídicos ou constituídos por componentes derivados de ácidos graxos e aminoácidos (JURENKA, 2004).

A maioria dos feromônios identificados até o momento, possuem estruturas simples, sendo poucos com estruturas complexas. Estruturas simples ou complexas, a biossíntese destes feromônios pode se dar pelo sequestro dessas moléculas das plantas nas quais os insetos se alimentam, isso ocorre quando o inseto não é capaz de sintetizar a molécula em seu organismo (JURENKA, 2004; TORRENS, 2015). Os insetos também têm a capacidade de fazer a chamada síntese “*De Novo*”, onde derivados de plantas podem ser ingeridos e modificados pelo inseto como feromônio. Por exemplo, o macho da mariposa *Utetheisa ornatrix* (L.) produz o feromônio sexual *R*- 2-hidroxiandina a partir de alcaloides de pirolizidina obtidos quando em forma de larvas, das plantas *Crotalaria spp* (JURENKA, 2004; TILLMAN et al, 1999; TORRENS, 2015).

O primeiro feromônio de inseto identificado foi em 1959 pelo pesquisador alemão Butenandt usando a mariposa do bicho-de-seda chamada *Bombyx mori* L.. O feromônio identificado e isolado foi resultado de uma pesquisa de 20 anos, sendo conhecido como bombicol, feromônio liberado pelas fêmeas dos bicho-de-seda mostrado na figura 6 (FERREIRA e ZARBIN, 1998).

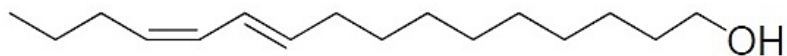


Figura 6. *Bombyx mori* e seu feromônio identificado (10*E*,12*Z*)- hexadecadien-1-ol (Bombicol).

Os feromônios quirais, feromônios que apresentam em sua estrutura química carbonos assimétricos, começaram a ser identificados no final de 1960, como no caso a exo-brevicomina, feromônio de agregação do *Dendroctonus brevicomis*, praga do pinho ocidental (MORI, 1998). Cada inseto possui o seu próprio código de comunicação. Como consequência, os feromônios produzidos são únicos, sendo a comunicação baseada nas diferenças estruturais ou proporções de cada composto produzido (BARALDI e CÔRREA, 2004).

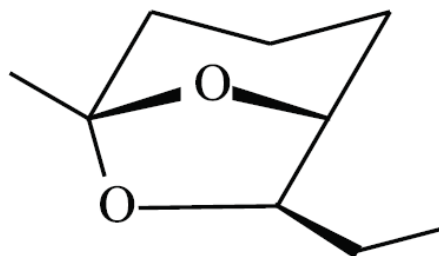


Figura 7. Exo-7-etil-5-metil-6,8-dioxabicyclo[3.2.1] octano (Exo-brevicomina) feromônio de agregação de *Dendroctonus brevicomis*.

A quiralidade da molécula é uma diferença estrutural que está relacionada com a atividade biológica dos feromônios produzidos por insetos, por isso é de extrema importância o conhecimento da configuração absoluta do feromônio em estudo (quando presente), uma vez que o inseto possui resposta ou por um enantiômero específico ou pela mistura racêmica (BACH, 2010; TORRENS, 2015). Vários feromônios apresentam centros quirais em suas estruturas e, frequentemente, apenas um dos enantiômeros é o responsável pela comunicação entre os insetos. Como exemplo, a espécie *Gnatthotricus retusus*, besouros da ambrosia, são sensíveis apenas ao isômero S do sulcatol (6-metil-5-hepten-2-ol) e a resposta é inibida pela ação do R. Contudo pode ocorrer que pares de enantiômeros sejam igualmente ativos ou que misturas de enantiômeros sejam mais ativas que os mesmos individualmente. Por exemplo, a broca-do-tronco-da-pereira, *Gnatthotricus sulcatus*, responde somente à mistura de 65% do isômero (S)-(+)-sulcatol e 35% do isômero (R)-(-)-sulcatol, não é atraída a nenhum dos dois isômeros separados (BARALDI e CÔRREA, 2004; BACH, 2010).

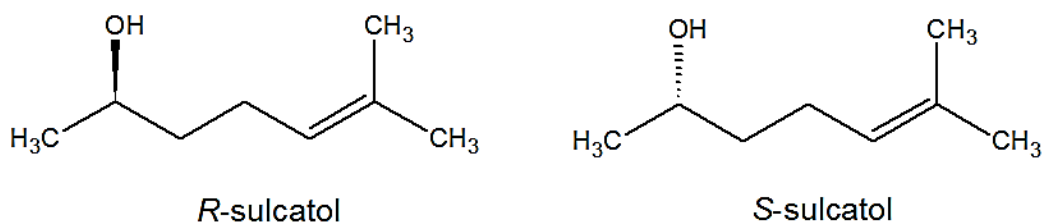


Figura 8. Enantiômeros *R* e *S* do sulcatol.

A configuração absoluta do feromônio pode ser identificada através da cromatografia gasosa com coluna quiral. O conhecimento da configuração é importante tanto pelo fato do inseto ser estereoseletivo e pelo fato de que caso ele obtenha resposta para a mistura racêmica, a produção desta é mais barata do que de um estereoisômero puro (OEHLISCHLAGER, 2016).

Outro fator estrutural muito importante, aparece em moléculas que não possuem centros quirais, mas possuem dupla ligação. A geometria da dupla ligação também vai interferir na atratividade da molécula, como exemplos temos o bombicol, produzido pelas fêmeas do bicho-de-seda, que como mostrado na figura 6 apresentam duas ligações duplas em sua molécula, uma com a geometria *E* na posição 10 e a outra com geometria *Z* na posição 12 (BARALDI e CORRÊA, 2004).

Compostos voláteis liberados pelas plantas podem atuar com sinergismo com o feromônio aumentando assim o seu poder de atração. Muitas armadilhas de semioquímicos utilizam pedaços de plantas hospedeiras ou frutas para aumentar o poder atração do feromônio em questão (OEHLSCHLAGER, 2016; FERREIRA, 2003; DUARTE et al, 2003).

Um exemplo de sinergismo foi relatado por Ambrogi e Zarbin (2008) que mostraram que os cinco compostos macho-específicos liberados por *Sternechus subsignatus* eram mais atraentes tanto para machos quanto para fêmeas quando combinados com extratos de soja (AMBROGI e ZARBIN, 2008). O mesmo efeito acontece para o *Anthonomus rubi*, uma importante praga de plantações de morangos, em que o seu feromônio de agregação identificado é uma mistura racêmica na qual apresenta baixa atratividade, mas quando combinado com o 1,4-dimetoxibenzeno (voláteis emitidos por flores de morango) sua atratividade é dobrada (WIBE, 2014).

Os feromônios mais empregados no controle de pragas são os feromônios de agregação e sexual. Os feromônios sintéticos podem ser utilizados em armadilhas para o monitoramento de pragas (Figura 9), podendo informar a presença e estimar a densidade populacional desta. Nesse tipo de monitoramento geralmente é utilizado feromônio sexual ou agregação sintético e tem como objetivos determinar o momento de controle e evitar o uso desnecessário de inseticidas (PINTO-ZEVALHOS e ZARBIN, 2013; ZARBIN, RODRIGUES e LIMA, 2009). No sul Estados Unidos esse tipo de armadilha é muito utilizado para o monitoramento da praga florestal *Dendroctonus frontalis* (TURCHIN e ODENDAAL, 2014). Por meio do monitoramento de praga pode-se estabelecer a

quantidade mínima de pragas atingidas para que possa iniciar o controle com inseticidas, como é o caso da praga do tomateiro *Neoleucinodes elegantalis* no qual é iniciado o controle com inseticidas quando a infestação atinge 5% dos frutos (GOULART et al, 2015).



Figura 9. Exemplo de armadilha para o monitoramento de pragas. Fonte: Google imagens.

Os feromônios podem ser utilizados também na redução de populações com base na estratégia da confusão sexual, evitando que o inseto encontre o sexo oposto para se reproduzir, sendo esse processo baseado na interferência ou inibição da transmissão dos sinais entre os parceiros sexuais. Um exemplo de emprego desse método é o controle da praga de cereais *Plodia interpunctella* no qual com a utilização deste método a taxa de acasalamento foi reduzida em quase 90% (GOULART et al, 2015). Outro exemplo do emprego dessa técnica é o controle da *Grapholita molesta* em plantações de maçã (Figura 10) que com o uso da confusão sexual houve cerca de 77% de redução da utilização de inseticidas na lavoura (MONTEIRO, SOUZA e BELLI, 2008).



Figura 10. Exemplo de armadilha para confusão sexual utilizada em plantações de maçã. Fonte: Google imagens.

Outra forma de uso dos feromônios sintéticos é a coleta massal (Figura 11), atraindo e concentrando um grande número de indivíduos para então eliminá-los. Na coleta em massa, o feromônio é usado para atrair o inseto para um recipiente de contenção visando à eliminação ou diminuição do inseto-praga no cultivo (PINTO-ZEVALHOS e ZARBIN, 2013). Um exemplo de sucesso do emprego desta estratégia é o uso do feromônio sexual de *Argyrotaenia velutinana* para a captura dos indivíduos machos em pomares de maçã (TRAMMEL, ROELOFS e GLASS, 2014). Outro exemplo de praga que tem sido controlada usando esta técnica, é a *Helicoverpa armigera*, uma das principais pragas da agricultura, que se destaca pelo seu ataque intenso nas regiões produtoras de soja, milho e algodão no Brasil (SILVA, 2002).



Figura 11: Exemplo de armadilha para coleta massal em plantação de algodão.
Fonte: Google imagens.

Outra forma que vem sendo recentemente utilizada para o controle de pragas é a técnica “push-pull” que consiste no cultivo de plantas que liberam semioquímicos para repelir os insetos pragas de uma determinada cultura (componente “push”) ou para atrair os insetos pragas para longe da cultura (componente “pull”), essas plantas são cultivadas no meio ou em torno da cultura principal (KHAN et al, 2016). Um exemplo de sucesso foi relato no controle da praga de leguminosas *Sitona lineatus*, em que um óleo de Neem foi utilizado como repelente causando a redução da população na cultura (GOULART et al, 2015).

Os feromônios apresentam vantagem quando comparados aos pesticidas por serem biodegradáveis, específicos apenas para determinadas espécies, podem ser usados em pequenas quantidades e o mais importante não são tóxicos, além de serem de fácil manipulação (GOULART et al, 2015).

No Brasil, a pesquisa na identificação, síntese e uso de feromônios tem se intensificado fortemente e atualmente, dos 447 insetos-praga presentes na agricultura brasileira, 103 espécies já tiveram seus feromônios identificados, sendo que 28 já estão disponíveis para comercialização (PINTO-ZEVALHOS e ZARBIN, 2013).

3.2. Semioquímicos na cocoicultura

As pragas constituem um dos fatores mais importantes para a produtividade da agricultura no mundo. Dentro da cocoicultura, estas não são diferentes, sendo uma das principais causas que afetam o desenvolvimento da cultura do coco, pois estas podem atrasar ou dificultar o crescimento da planta, podem impedir a produção da planta, como também podem levar a morte destas, provocando perdas significativas na plantação (FERREIRA e FONTES, 2006).

Dentre as principais pragas desta cultura destacam-se os ácaros *Aceria guerreronis* e *Amrineus cocofolius*, a traça *Hyalospila ptychis*, os curculionídeos *Rhinostomus barbirostris*, *Rhynchophorus palmarum* e *Homalinotus coriaceus*, e a lagarta desfolhadora *Brassolis sophorae*, além de sugadores, raspadores, e outras espécies presentes em toda sua zona de cultivo (FERREIRA, 2008).

Para muitas dessas pragas de coco o único método de controle é a derrubada da planta infectada, ou pulverizações constantes nas plantações. Muitas vezes os inseticidas não possuem tanta eficácia no controle destas, pela dificuldade de alcance. Com isso, os semioquímicos vem sendo umas das alternativas para o combate destas.

Como pode ser visto na tabela 1, algumas pragas de coco e demais palmáceas que já tiveram seus feromônios identificados, *Dynamis borassi*, *Metamasius hemipterus*, *Rhynchophorus spp.*, e o *Strategus aloeus* (AMBROGI et al, 2009; ROCHAT et al, 2000).

Tabela 1. Feromônios identificados para as principais pragas de coqueiro

Família	Espécie	Compostos
Curculionidae	<i>Dynamis borassi</i>	(4S, 5S) - 4- metil-nonan-5-ol
Curculionidae	<i>Metamasius hemipterus</i>	(4S, 5S) - 4- metil-nonan-5-ol, 2-metil-heptan-4-ol, 2-metil-octan-4-ol, nonan-5-ol e 3-hidroxi-4-metil-nonan-5-ona
Curculionidae	<i>Rhynchophorus bilineatus</i>	(4S, 5S) - 4- metil-nonan-5-ol
Curculionidae	<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>	(4S, 5S) - 4- metil-nonan-5-ol e 4-metilnonan-5-ona
Curculionidae	<i>Rhynchophorus vulneratus</i>	(4S, 5S) - 4- metil-nonan-5-ol, 4-metil-nonan-5-ona e 3-metil-octan-4-ol
Curculionidae	<i>Rhynchophorus palmarum</i>	(S, E)-6-metil-hept-2-en-4-ol
Curculionidae	<i>Rhynchophorus phoenicis</i>	(3S, 4S) 3-metil-octan-4-ol
Scarabaeidae	<i>Strategus aloeus</i>	2-butanona, 3-pentanona e sec-butilacetato

Um exemplo de sucesso no emprego de semioquímicos sintético para o controle de pragas de coco no Brasil é o uso do Rincoforol ((S, E)-6-metil-2-hepten-4-ol), feromônio de agregação da broca-do-olho do coqueiro, *Rhynchophorus palmarum* L. O *R. palmarum* é uma das pragas mais importantes das plantações de coco e pode utilizar a cana-de-açúcar, o dendezeiro, mamoeiro e o abacaxizeiro, como fonte de alimento e como planta hospedeira. O Rincoforol foi identificado em 1991 e teve sua estereoquímica e atividade biológica confirmada em 1992, sendo que ele demonstra maior eficiência quando associado a pedaços de cana-de-açúcar, abacaxi, estipe de coqueiro e ráquis. Testes de laboratório comprovaram que o uso deste feromônio sintético junto com inseticida é eficiente para o controle dessa praga, que também é responsável pela doença

do anel vermelho em dendezeiros (NAVARRO et al, 2002; DUARTE e LIMA, 2001; OEHLSCHLAGER, 2016).

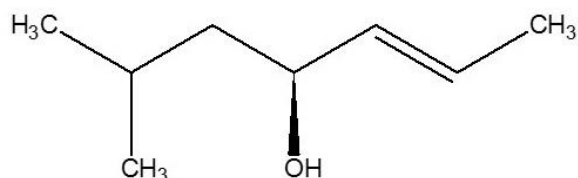


Figura 12. Estrutura química do (S, E)-6-metil-2-hepten-4-ol, conhecido como Rincoforol.

3.3. Família Curculionidae e seus feromônios identificados

A família Curculionidae apresenta 60.000 espécies descritas na literatura. Os besouros pertencentes a essa família, cuja suas principais características são a cabeça prolongada em um rostro de comprimento variável, apresentam antenas clavadas e geniculadas. Tanto os besouros adultos quanto as larvas são fitófagos, podendo se alimentar de qualquer parte do vegetal. Os curculionídeos adultos apresentam vida longa, maior que um mês, e dependem essencialmente dos alimentos para reproduzir (AMBROGI et al, 2009; MOREIRA, ZARBIN e CORACINI, 2005).

A maioria dos feromônios identificados para curculionídeos são produzidos pelos machos e atraem ambos os sexos. Entretanto, há relatos de feromônios produzidos por fêmeas, que são os feromônios sexuais de longa distância, feromônios de contato, que permitem conhecer coespecíficos, e os feromônios de oviposição, que são utilizados para marcar onde depositaram seus ovos (AMBROGI et al, 2009).

Muitas espécies de curculionídeos atuam como pragas tanto em plantações quanto nos locais de armazenamento de grãos. Entre as principais pragas desta família estão: *Anthonomus grandis*, o bicudo do algodão; *Eutinobothrus*

brasiliensis, broca da raiz do algodoeiro; *Sphenophorus levis*, bicudo da cana-de-açúcar; *Rhinostomus barbirostris*, broca-de-estipe-do-coqueiro e *Rhynchophorus palmarum*, brocas das palmeiras (ZARBIN, RODRIGUES e LIMA, 2009; AMBROGI et al, 2009).

Várias pragas da família Curculionidae já tiveram seus feromônios identificados e os compostos correspondem, basicamente, a duas classes: monoterpenoides (majoritariamente cíclicos) e possíveis derivados de ácidos graxos (álcoois, cetonas, e ésteres com ramificações metilas e com número variável de 5 a 10 carbonos na cadeia principal) (AMBROGI et al, 2009). De acordo com Ambrogi et al. (2009) os insetos da subfamília Dryophthorinae, produzem álcoois secundários contendo de 5 a 10 carbonos com ramificações metílicas (Figura 11), que são provavelmente derivados de ácidos graxos, com exceção do inseto *Cosmopolites sordidus*, para o qual 4 isômeros de um novo cetol bicíclico (sordidina) foram identificados como componentes do feromônio. Dentro dessas subfamílias algumas cetonas também podem ser encontradas nos feromônios, como pode ser visto na figura 13.

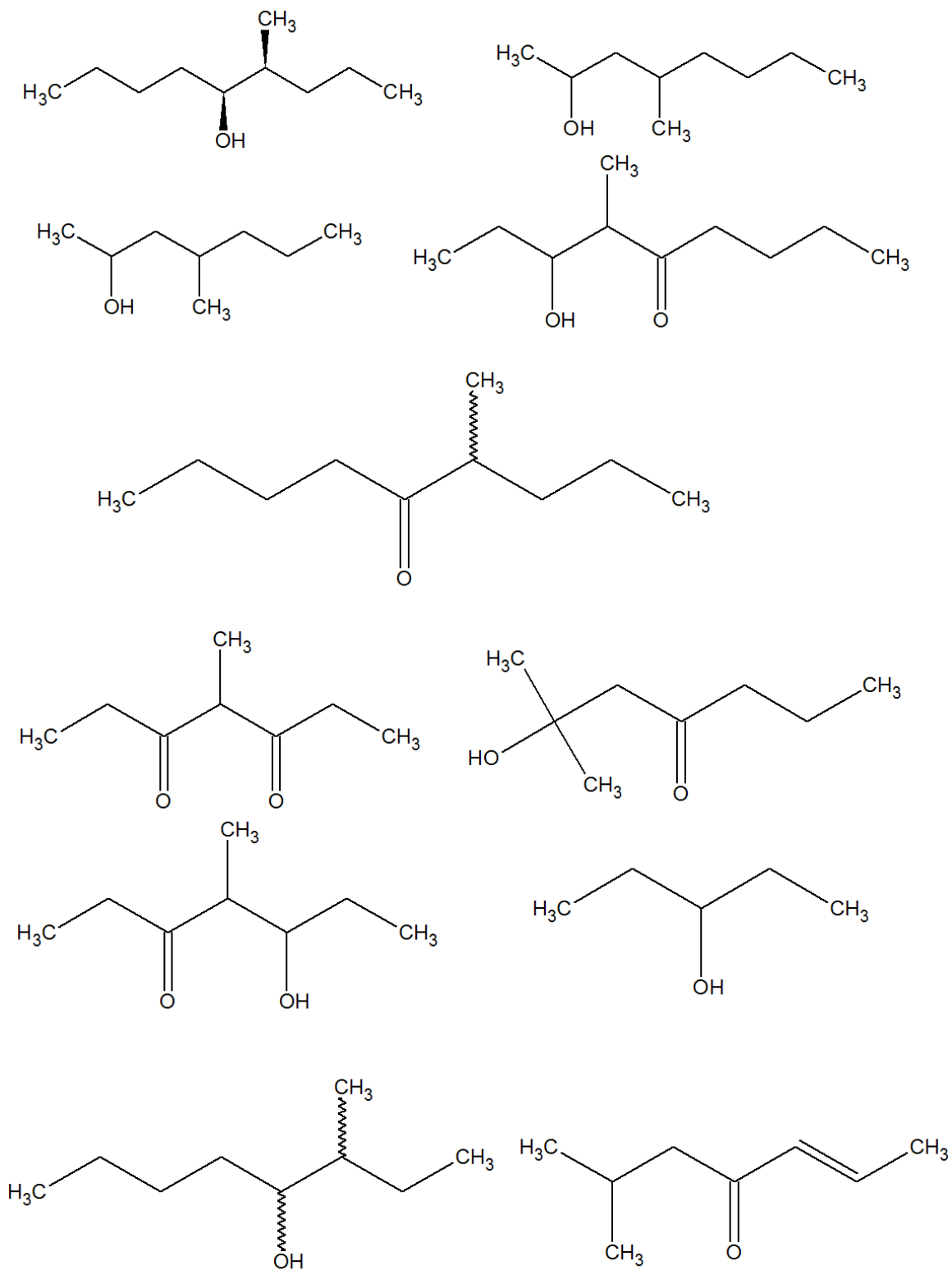


Figura 13. Feromônios identificados para a subfamília Dryophthorinae (AMBROGI et al, 2009).

Embora haja poucas pesquisas com uso de semioquímicos no Brasil, com relação aos outros países, os estudos dos semioquímicos presentes na comunicação dos insetos-pragas vem ganhando importância, tornando assim uma proposta promissora para a diminuição do uso de pesticidas no controle de pragas.

4. METODOLOGIA

4.1. Criação dos insetos

Estipes de coqueiro contendo larvas e pupas de *R. barbirostris* foram fornecidas pela Estação Experimental Lemos Maia (CEPEC), em Una/BA, latitude 15° 17' 36" S e longitude 39° 04' 31" W. Os pedaços de estipes foram envolvidos com tela plástica e à medida que os insetos foram emergindo do estipe, foram identificadas, separados por sexo e colocados em gaiolas plásticas contendo toletes de cana-de-açúcar para sua alimentação (Figura 14). Estes foram mantidos em condições ambientes de temperatura, umidade e fotoperíodo.

A separação do sexo foi realizada com base na diferença do rostro, o macho apresenta rostro mais longo do que a fêmea e coberto por pelos avermelhados como pode ser observado na figura 15.



Figura 14. Modo de captura e criação do *Rhinostomus barbirostris*.



Figura 15. Método para identificação de machos e fêmeas da espécie *Rhinostomus barbirostris* através da diferenciação do rostro.

4.2. Coleta de voláteis

Para a obtenção dos voláteis foi utilizado o método de aeração (NAVARRO et al, 2002; FÁVARO, SANTOS e ZARBIN, 2012). Os insetos machos e fêmeas foram separados em câmaras de vidros (A), sob condições ambiente. Uma bomba de vácuo (B) gerou um fluxo contínuo de ar (1mL/min) umidificado (C) e filtrado com carvão ativado (D), passando pelas câmaras e carregando todos os voláteis liberados pelos insetos e pelas plantas para o polímero adsorvente Hisep localizado em colunas de vidro conectadas às câmaras (E), onde foram retidos (Figura 16).

A cada 24 h de aeração, os compostos retidos no polímero foram eluídos com 800 μ L de hexano grau HPLC (Sigma-Aldrich) e os extratos foram armazenados no congelador, para posteriores análises químicas e bioensaios.

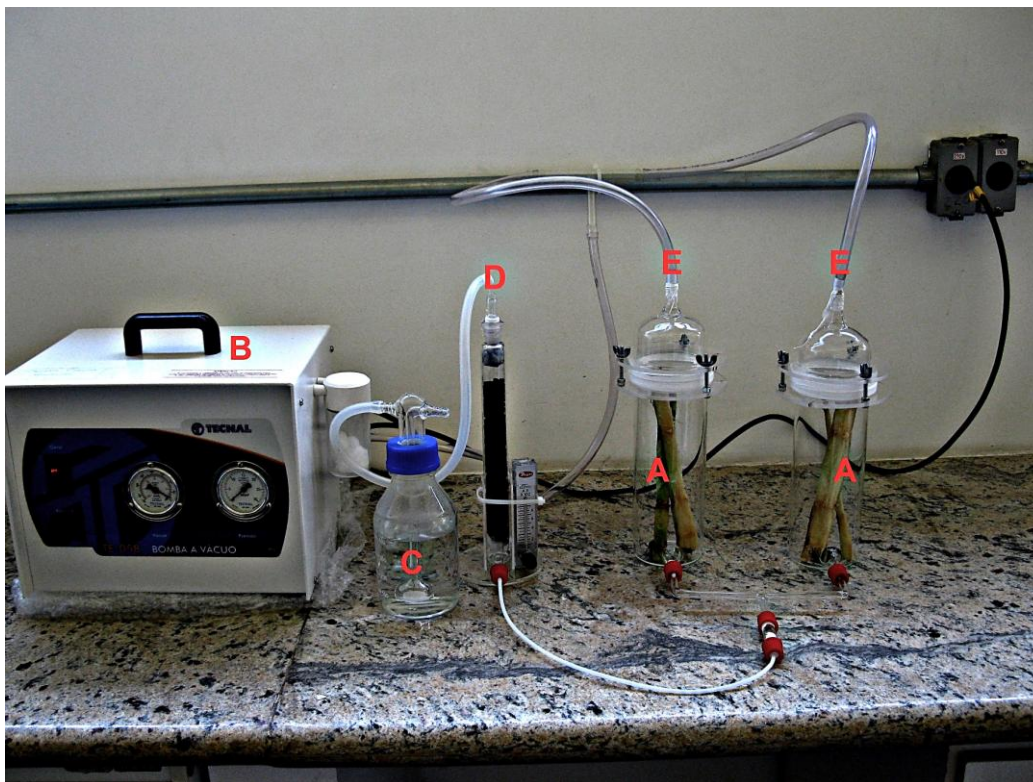


Figura 16. Sistema de aeração para coleta de voláteis.

4.3. Análises químicas dos extratos

Os extratos de voláteis foram analisados (1 μL de extrato) por cromatografia gasosa usando um cromatógrafo, modelo Varian CP-3800, equipado com detector de ionização de chama (CG-DIC) e com coluna capilar VF-5MS (30 m x 0,25 mm D.I. x 0,25 μm). O CG foi operado em modo splitless (250 $^{\circ}\text{C}$), com programação de temperatura iniciada a 40 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, aumentando 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 150 $^{\circ}\text{C}$, depois aumentando de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 250 $^{\circ}\text{C}$ e permanecendo nessa temperatura por 10 min. O Hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1,5 mL/min.

Os espectros de massas foram obtidos através de um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) modelo Shimadzu QP- 2010 Plus com ionização por impacto de elétrons (70 eV), com coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm D.I. x 0,25 μm de filme). O CG foi operado em modo splitless (250 $^{\circ}\text{C}$), com programação de temperatura de 40 $^{\circ}\text{C}$ por 3 min, aumentando 7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até

250 °C e permanecendo a esta temperatura por 10 min e Hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1 mL/min e a linha de transferência operou a 270 °C.

Os extratos também foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a um IVTR, Shimadzu GC2010 acoplado a um espectrofotômetro na região de infravermelho com transformada de Fourier (CG-IVTF) DiscovIR-GC (Spectra Analysis, Marlborough, *Massachusetts*, USA; 4000-750 35 cm⁻¹, resolução, 8 cm⁻¹). A coluna capilar, o modo de injeção e a programação de temperatura foram as mesmas descritas para as análises de CG-MS (Shimadzu).

As análises dos extratos por CG-EM e CG-IVTF foram realizadas no Laboratório de Semioquímicos da Universidade Federal do Paraná, sob supervisão do professor Paulo Zarbin.

4.4. Índice de Kovats

Para o cálculo de índice de Kovats, 1 µL de uma solução padrão de hidrocarbonetos do C10 ao C26 foi injetado no CG-DIC nas mesmas condições cromatográficas em que foram analisadas os extratos de voláteis (MUHLEN, 2009).

Através dos cromatogramas obtidos foi realizado os cálculos com base na seguinte fórmula:

$$KI = 100y + 100(z-y) * \frac{(tr_x - tr_y)}{(tr_z - tr_y)}$$

Onde:

Tr_x = tempo de retenção dos compostos de interesse

Y= número de carbonos do hidrocarboneto que elui antes do composto X

Z= número de carbonos do hidrocarboneto que elui depois do composto X

4.5. Bioensaios em laboratório

Os extratos obtidos foram testados em arena, onde foram analisadas as reações comportamentais dos insetos fêmeas e machos em relação aos extratos de voláteis obtidos pela aeração. Primeiramente foram realizados testes somente com hexano para testar a interferência deste frente a atratividade dos insetos. Posteriormente, em uma extremidade da arena foi colocado uma fonte de odor que consistiu em um pedaço de algodão impregnado com extrato de fêmeas, na extremidade oposta foi colocada uma fonte de odor que consistiu um pedaço de algodão impregnado com extrato de macho. Um inseto macho ou fêmea foi colocado no meio da arena e seu comportamento foi observado por 15 minutos, como pode ser observado na figura 17. Se o inseto caminhasse em direção a um dos odores, era considerado como “resposta”; caso contrário foi considerada como “não resposta”. Esse procedimento foi realizado com 40 insetos (20 machos e 20 fêmeas), no qual 33 insetos tiveram resposta e 7 insetos sem resposta, a fonte de odor foi renovada a cada experimento. As respostas machos e fêmeas frente aos extratos foram analisadas pelo teste Qui-Quadrado (FÁVARO, 2012).

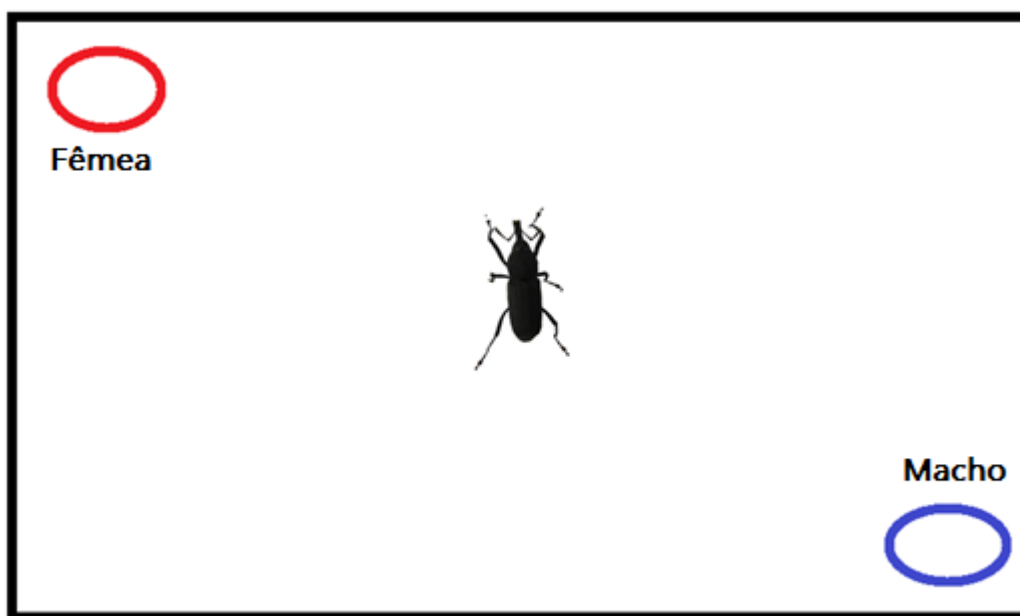
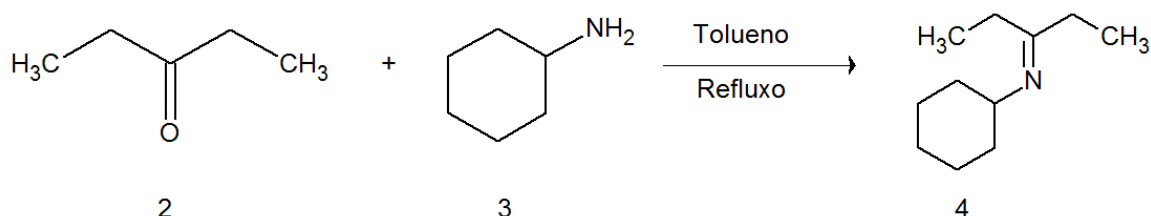


Figura 17. Ilustração de bioensaios em arena.

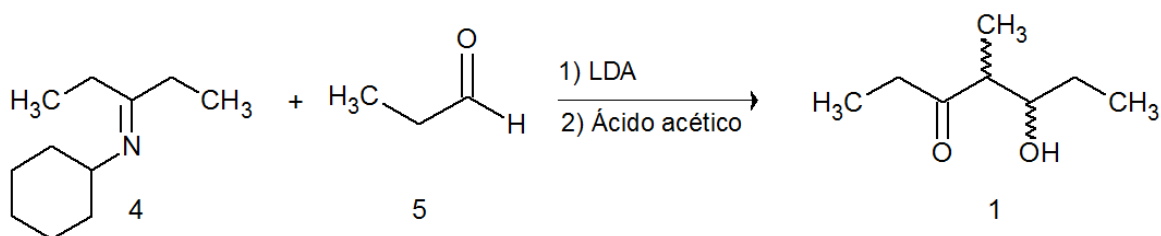
4.6. Síntese do feromônio

4.6.1. Síntese do *N*-ciclohexil-3-pentaimina (4)



Uma solução contendo 3-pentanona **2** (3,00 g; 34,83 mmol) e ciclohexilamina **3** (3,45 g; 34,83 mmol) em tolueno (156 mL) foi refluxada com o uso de Dean-Stark para remoção de água. Após o período de 3 horas a solução foi resfriada até a temperatura ambiente, seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi removido utilizando o evaporador rotatório (SZCZERBOWSKI, 2016). O produto foi obtido com 55,9 % de rendimento e utilizado na próxima etapa sem purificação.

4.6.2. Síntese do 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona (1)



A uma solução de di-isopropilamina (0,40 g; 4,00 mmol) em THF anidro (8,75 mL) resfriada a 0°C, foi adicionado n-butillítio (2,4 mL; 4,00 mmol; solução 1,96 mol/L) e esta mistura foi agitada durante uma hora mantendo o resfriamento. Separadamente foi preparada uma solução de *N*-ciclohexil-3-pentaimina **4** (0,5 g; 3 mmol) em THF anidro (18 mL) e resfriou-se a -78°C. Sobre esta mistura foi

adicionado à solução de Diisopropilamida de Lítio (LDA) preparada anteriormente. A mistura foi agitada com a temperatura mantida a -78°C durante 30 minutos, após esse período a solução foi colocada em banho de gelo.

Uma solução de propanal **5** (0,092g; 1,59 mmol) em THF anidro (2,5 mL) foi adicionada lentamente à mistura reacional e a agitação continuada durante 14 horas. Após este período, foi adicionada uma solução de ácido acético (2,8 mL em 16,8 mL de água) e agitado durante 3 horas. O meio reacional foi extraído com acetato de etila e a fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO_3 (3 x 100 mL), solução saturada de NaCl , seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente foi removido utilizando o evaporador rotatório (SZCZERBOWSKI, 2016). O produto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando gradiente hexano e acetato de etila na proporção 8:2, depois 2:1 e por último 1:1. O produto final foi obtido com 73,49% de rendimento e com 6,38 % de rendimento global.

4.7. Caracterização química do composto sintético

Os espectros de massas e infravermelho dos compostos sintéticos foram obtidos por análises dos compostos em solução de hexano (1000 ppm) nos mesmos equipamentos (Shimadzu) e condições descritas no item 4.3.

Para a obtenção dos espectros de RMN, foi usado um espectrômetro Bruker ARX-200[®] (DQ-UFPR) a 200 (^1H) e 50 MHz (^{13}C), utilizando como solvente clorofórmio deuterado e tendo como referencia o tetrametilsilano (TMS).

4.8. Teste de campo

Foi realizado teste de campo para avaliar a atratividade da mistura racêmica frente aos *Rhinostomus barbirostris* em seu habitat natural. O teste foi realizado em outubro de 2016, em duas fazendas localizadas no município de Una, Bahia.

As armadilhas utilizadas foram duas do tipo balde (A) e duas do tipo tubo de PVC (B) que tiveram suas extremidades fechadas para evitar que os insetos escapassem, como pode ser observado na figura 18, nas quais foram colocados

ependorfs furados com agulha de costura com diferentes concentrações da mistura racêmica. Essas armadilhas foram denominadas como:

A1= composto puro 350 μ L

A2= composto puro 250 μ L

A3= composto puro 150 μ L

B= solução 150 μ L do composto + 150 μ L de hexano

Em todas as quatro armadilhas foram colocados pedaços de cana para que aumentasse a atratividade destas. Após um período de sete dias, as armadilhas foram retiradas para que pudesse ser feita a avaliação do teste.

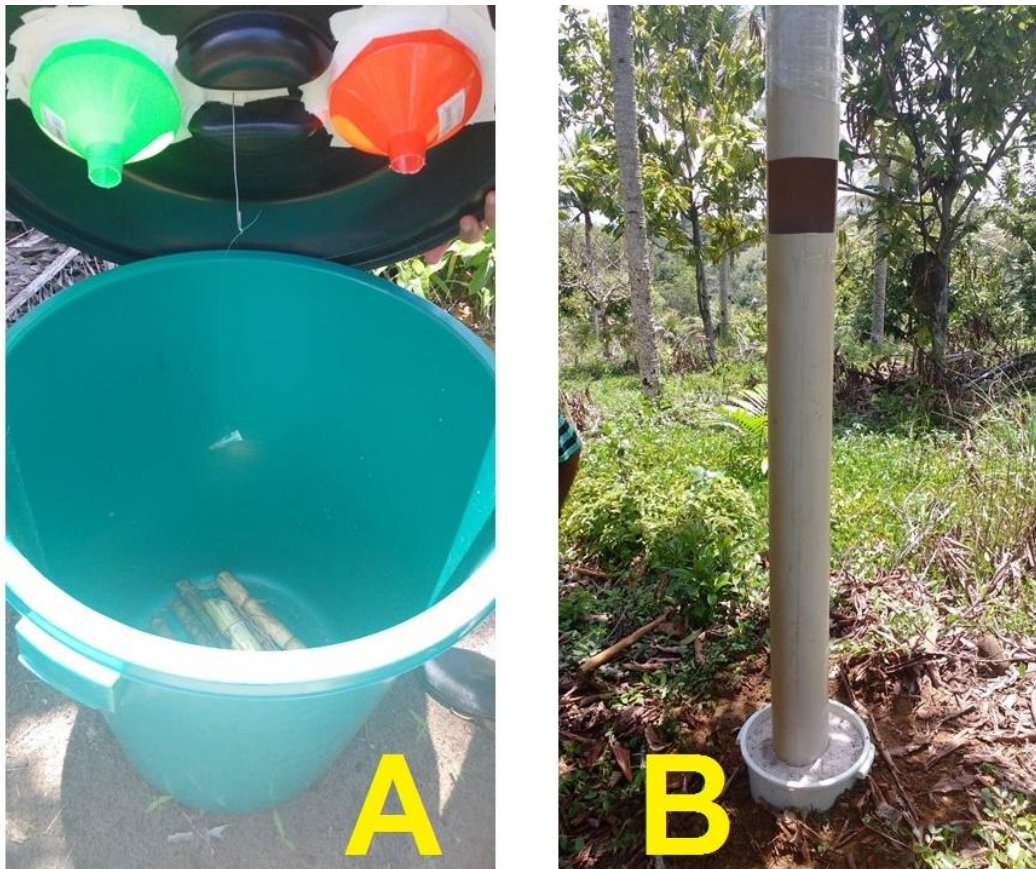


Figura 18. Armadilhas utilizadas para a captura do *R. barbirostris*, A armadilha tipo balde e B armadilha tipo tubo PVC.

Um Segundo teste foi realizado apenas com armadilhas do tipo Tubo PVC, no qual foram utilizadas quatro armadilhas uma contendo solução de 200 μL de hexano e 200 μL do composto puro e as demais contendo 150 μL de hexano e 150 μL de composto puro. As armadilhas foram colocadas em uma única fazenda em quatro pontos diferentes. Após um período de sete dias, as armadilhas foram retiradas para que pudesse ser feita a avaliação do teste

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cromatogramas obtidos das análises dos voláteis de adultos machos e fêmea da espécie *R. barbirostris* pela técnica de CG- DIC, mostraram a presença de dois compostos (A e B) produzidos somente pelos machos, como pode ser observado na Figura 19.

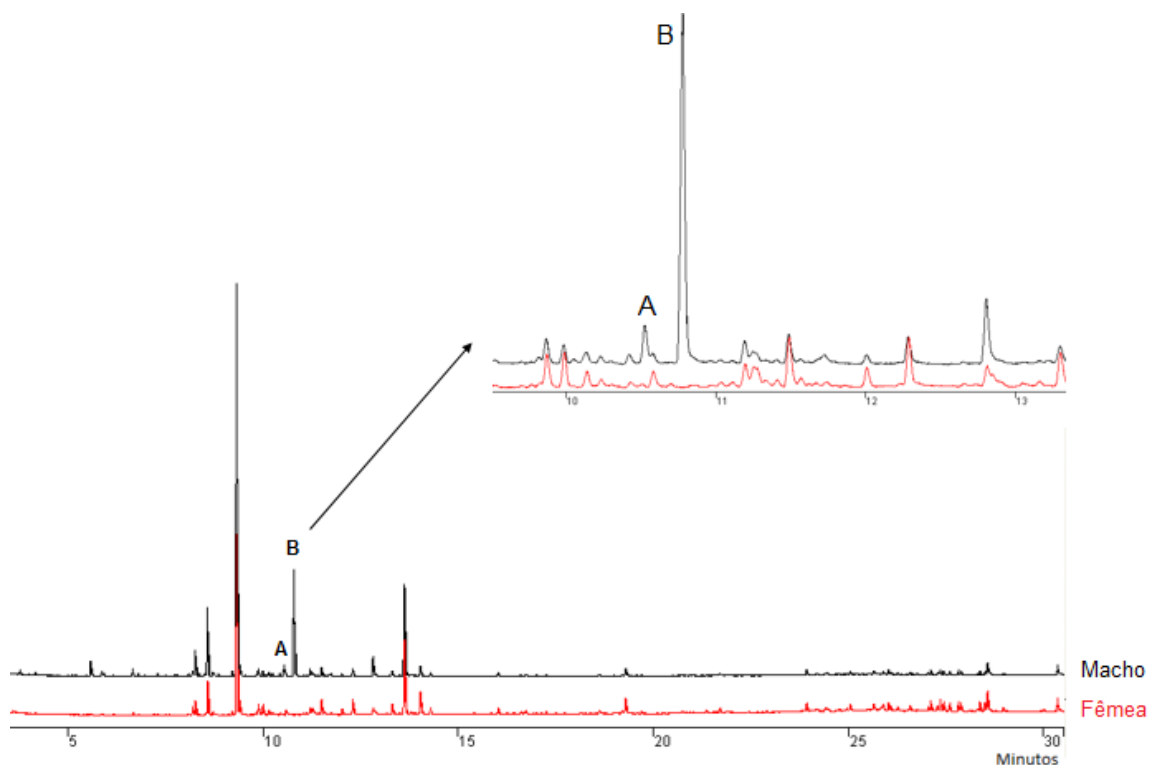


Figura 19. Comparação do cromatogramas obtidos das análises dos voláteis liberados por machos e fêmeas de *Rhinostomus barbirostris* pela técnica CG-DIC, mostrando o composto macho-específico.

Os índices de Kovats para os dois compostos foram calculados utilizando como padrão hidrocarbonetos de C10 a C26. O índice para o composto A foi o valor de 1073 e para o composto B o valor de 1084.

Para saber se os extratos que continham os compostos macho-específicos eram atrativos, foram realizados bioensaios em arena. Neste teste, os insetos

foram submetidos a duas fontes de odores, uma fonte continha o extrato dos voláteis de macho com alimento (cana-de-açúcar) e a outra fonte de odor continha o extrato dos voláteis da fêmea com o alimento.

Dos quarenta insetos testados sete não responderam, 26 insetos (13 machos e 13 fêmeas) foram atraídos para a fonte de odor contendo o extrato do macho, e apenas sete insetos foram em direção à fonte de odor contendo o extrato da fêmea (4 machos e 3 fêmeas). Dessa forma, foi possível observar uma preferência para os extratos dos voláteis de macho tanto para fêmeas quanto para machos coespecíficos, evidenciando assim que há presença de um feromônio de agregação nos extratos de voláteis de macho dessa espécie. Os dados desse teste podem ser observados no gráfico 1.

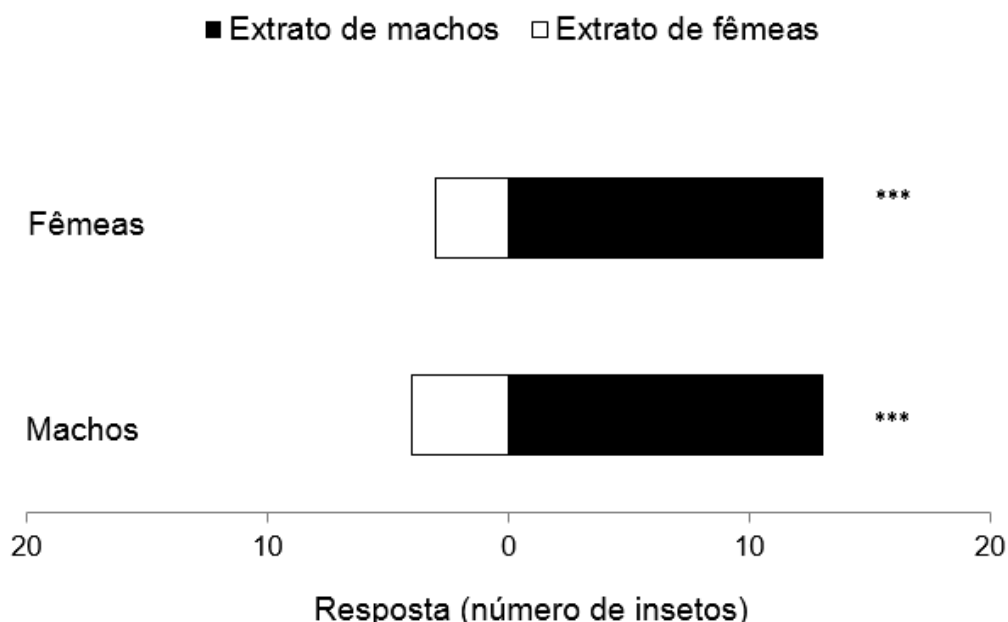


Gráfico 1. Respostas de machos e fêmeas *Rhinostomus barbirostris* aos extratos de voláteis produzidos pelos machos e fêmeas coespecíficos. Os dados foram analisados com teste Q-Quadrado ($p < 0,0001$).

Os feromônios possuem características multicomponentes, a mistura feromonal é constituída normalmente por dois ou mais compostos. Espécies de

mesma família tem tendência de apresentar vários componentes em comum, mas, devido a característica da especificidade, ao menos um composto é diferente ou as proporções entre eles são bem distintas, tornando-os assim espécie-específicos (THOMAZINI, 2009).

Trabalhos descritos na literatura mostram que na família Curculionidae é muito comum feromônios de agregação produzidos pelos machos, como é o caso dos insetos da subfamília *Rhynchophorus spp.*, *Dynamis borassi*, *Metamasius hemipterus*, *Rhabdoscelus obscurus* e *Paramasius distortus* (GIBLIN-DAVIS, 1996). Por exemplo, o *Rhynchophorus ferrugineus*, conhecido como escaravelho vermelho, é uma importante praga de palmeiras, que tem seu feromônio de agregação produzido pelos machos, identificado como (4S, 5S)-4-metil-5-nonanol (ferrugineol) (GIBLIN-DAVIS, 1996; ÁVALOS e SOTO, 2015). Os feromônios de agregação são compostos químicos que servem para atrair indivíduos de uma mesma espécie seja para alimentação ou para reprodução, atraindo ambos os sexos (GIBLIN-DAVIS, 1996).

Para a elucidação estrutural dos compostos A e B foram realizadas análises dos extratos pelas técnicas de CG-EM e CG-IVTR. Os dois compostos macho-específicos, A e B, apresentaram índices de Kovats próximos e espectros de massas e infravermelho semelhantes, sugerindo que estes sejam diastereoisômeros.

No espectro de infravermelho referente ao composto majoritário (Figura 20), foi possível observar bandas características da cadeia carbônica, a banda em 968 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-C em alcanos, também é possível observar bandas em 1372 cm^{-1} que caracteriza a presença de um grupo metila e suas vibrações C-H, a banda 1457 cm^{-1} referente a grupos metilenos e seus estiramento C-H e as a bandas em 2878, 2939 e 2974 cm^{-1} , refere ao estiramento C-H da cadeia carbônica. Pode ser observada também as bandas característica de álcoois em 1100 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação C-O em álcoois secundários e a banda em 3352 cm^{-1} referente ao estiramento O-H. Por fim, foi observada a banda em 1708 cm^{-1} referente ao estiramento C=O de carbonilas

alifáticas (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1998). A partir das bandas observadas, foi sugerido de que a molécula é uma hidroxicetona.

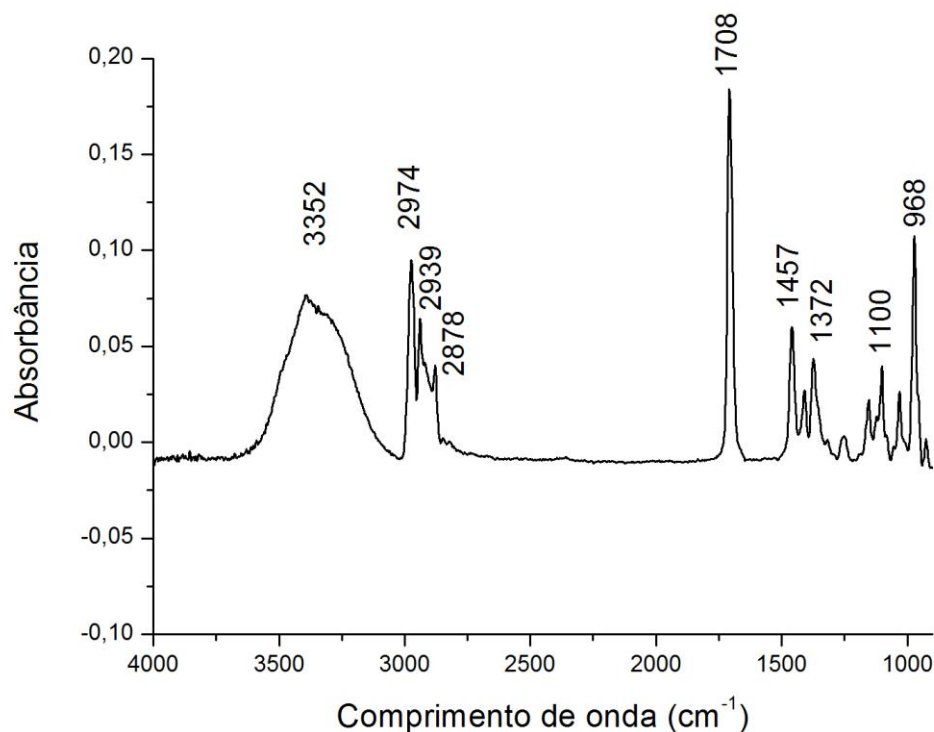


Figura 20. Espectro de infravermelho do composto macho-específico majoritário (B) produzido por *Rhinostomus barbirostris*.

O espectro de massas do composto majoritário (Figura 21) apresenta como principais fragmentações o pico base em m/z 57 (100%) referente à clivagem da ligação C-C adjacente à função cetona na posição C3 da cadeia carbônica, o fragmento m/z 86 (27%) é resultante do rearranjo de McLafferty (Figura 22), muito comum quando se tem a presença de um grupo carbonila e um hidrogênio na posição γ , sendo assim, muito importante para a caracterização de compostos carbonilados. Outros fragmentos característicos podem ser observados em m/z 97 (12%) referente a perda do grupo etila após a saída de uma molécula de água. Podem ser observados também o fragmento m/z 115 (6 %) referente a eliminação

de um grupo etila (C_2H_5), o fragmento em m/z 126 (11%) originado pela perda de uma molécula de água ($M^+ - 18$), fragmento característico de álcoois e o pico m/z 143 (0,1%), referente a $M^+ - 1$ (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1998).

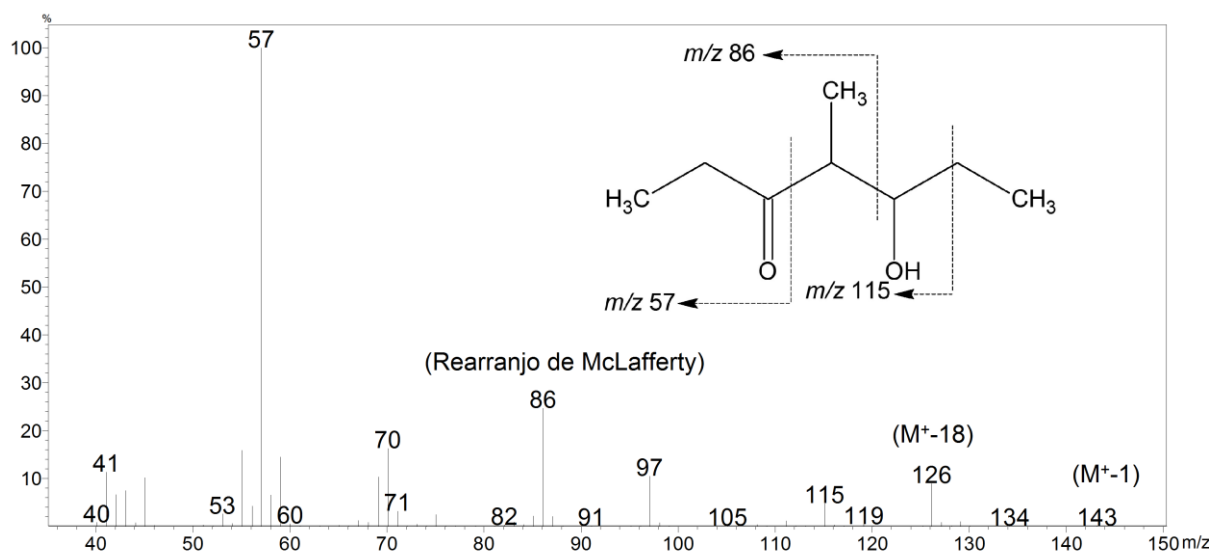


Figura 21. Espectro de massas do composto macho-específico majoritário (B) produzido por *Rhinostomus barbirostris*.

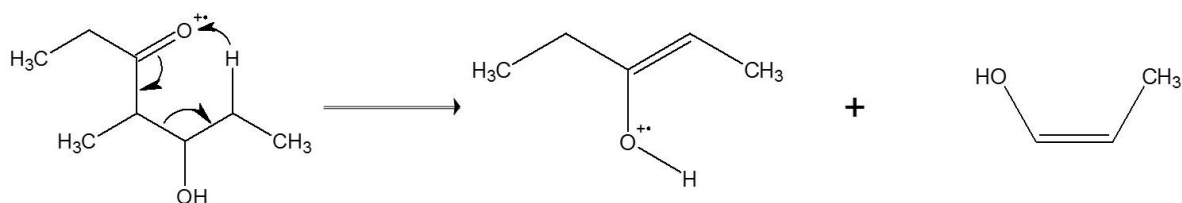


Figura 22. Rearranjo de McLafferty resultando no fragmento m/z 86.

Através do estudo do padrão de fragmentações e das bandas presentes no espectro na região do IV e pela comparação com os dados obtidos na literatura das estruturas identificadas para a subfamília Dryophthorinae, a 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona (Figura 23) foi proposta como sendo o feromônio de agregação produzido pelos machos do *R. barbirostris*. Phillips et. al (1985), relataram em sua pesquisa que os diastereoisômeros (*R*, *S*) e (*R*, *R*)-5-hidroxi-4-metilheptan-3-ona,

em análises por CG-EM por impacto de elétrons, apresentaram tempo de retenção próximos e justificam a diferença do tempo de retenção pelo impedimento estérico e por ligações de hidrogênio intramoleculares.

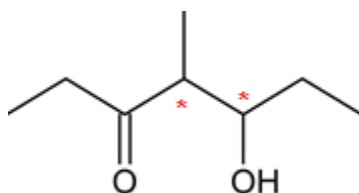


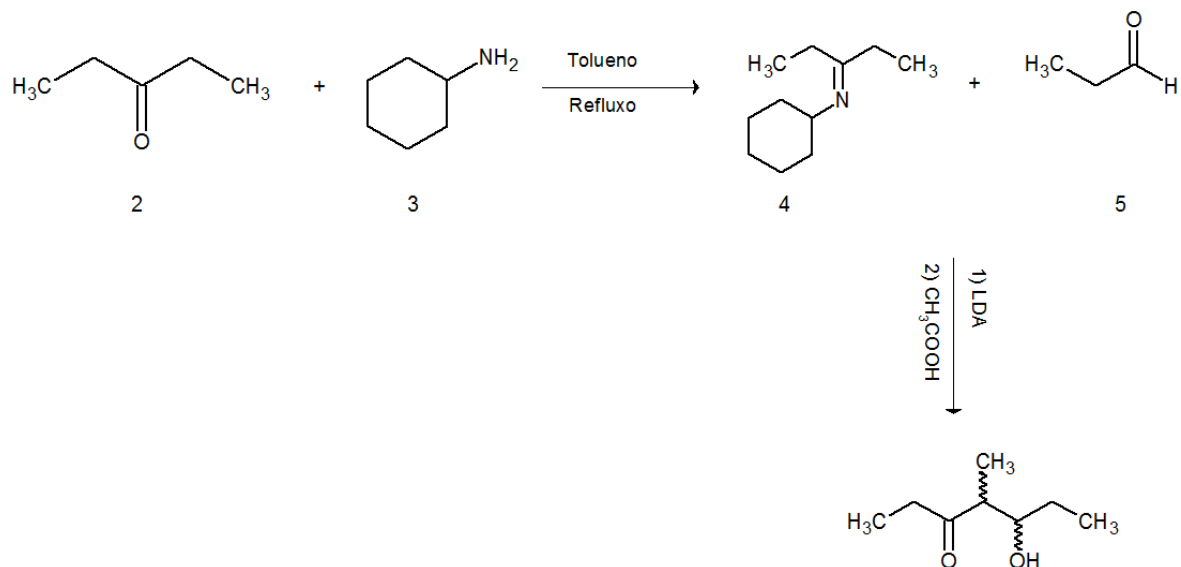
Figura 23. Estrutura química proposta para os compostos macho-específicos produzidos por *R. barbirostris*.

Bohman e Unelius (2009) propõe a síntese dos quatro enantiômeros da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona e relata as porcentagens das fragmentações encontradas nos espectros da análise por CG-EM, como sendo m/z 126 (15 %), m/z 97 (14 %), m/z 86 (37%), m/z 70 (18%), m/z 69 (11%), m/z 59 (16%), m/z 57 (100 %) e m/z 55 (15%). Nas análises dos extratos de voláteis dos machos de *R. barbirostris* no CG-EM, como pôde ser visto anteriormente, os espectros apresentaram porcentagens dos fragmentos próximas a aquelas que os autores relataram. Essa similaridade pode ser vista nos fragmentos em m/z 97 (12%), m/z 70 (18%) e m/z 55 (15%), atestando que a estrutura proposta para o composto majoritário é válida.

Esse mesmo composto já foi identificado como feromônio de agregação produzido pelos machos das espécies *Sitophilus oryzae*, que é um gorgulho praga do arroz, o *S. zeamais* uma importante praga de milho, sendo comumente conhecido como sitophinona (PHILLIPS et al., 1985). Este também, foi identificado como um dos componentes feromonal para a espécie *S. granarius* gorgulho praga de celeiros. Todas essas três espécies são da família Curculionidae e pertencem à sub-família Dryophthorinae, a mesma de *R. barbirostris*, comprovando que este composto pode ser mesmo o feromônio de agregação produzido pelo macho do *R. barbirostris* (AMBROGI et al., 2009). Como dito anteriormente, mesmo que

espécies diferentes produzam o mesmo composto a concentração produzida varia entre essas espécies, tornando-o assim específico somente para aquela espécie.

A síntese racêmica da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona **1** foi realizada para a confirmação da estrutura química do feromônio produzido pelo *R. barbirostris*. A rota sintética foi dividida em duas etapas, como pode ser visto no esquema a seguir:



Esquema 1: Rota sintética da mistura racêmica 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona **1**.

Na primeira etapa foi realizada a reação entre a 3-pentanona **2** com a ciclohexilamina **3** originando a *N*-ciclohexil-3-pentaimina **4**, em 56% de rendimento. Nessa etapa, a amina condensa com o grupo carbonila da cetona formando um produto intermediário tetraédrico que sofre protonação do oxigênio, levando assim a perda de uma molécula de água e a formação do íon ímínio, gerando a imina através da transferência de prótons para molécula da água. O produto foi caracterizado por CG-EM (Figura 24), onde foi possível verificar o pico base em m/z 56 (100 %) atribuído a (C₃H₅N + H), o fragmento em m/z 83 (85%) referente ao cátion ciclopentila (C₅H₉), o fragmento em m/z 86 (38%) referente a eliminação de C₆H₉, o pico em m/z 138 (36%) caracterizado pela perda de C₂H₅ e

o pico do íon molecular em m/z 167 (17%) (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1998).

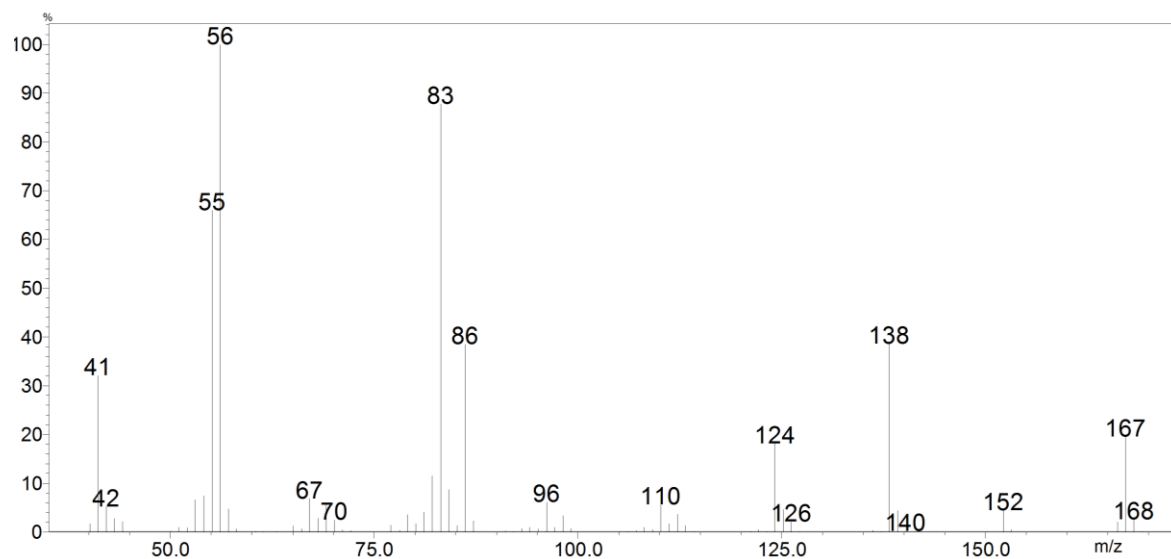


Figura 24. Espectro de massas da *N*-ciclohexil-3-pentamina **4**.

Foi realizado também a caracterização por CG-IVTR e no espectro de infravermelho (Figura 25) pode ser observada, a banda em 957 cm^{-1} referente a vibração da ligação C-C em alcanos, a banda em 1449 cm^{-1} referente a deformação angular assimétrica de C-H de grupos metilas e a banda em 1661 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=N. As bandas em 2855 , 2929 , 2971 cm^{-1} correspondem as deformações axiais C-H em alcanos e cicloalcanos (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1998).

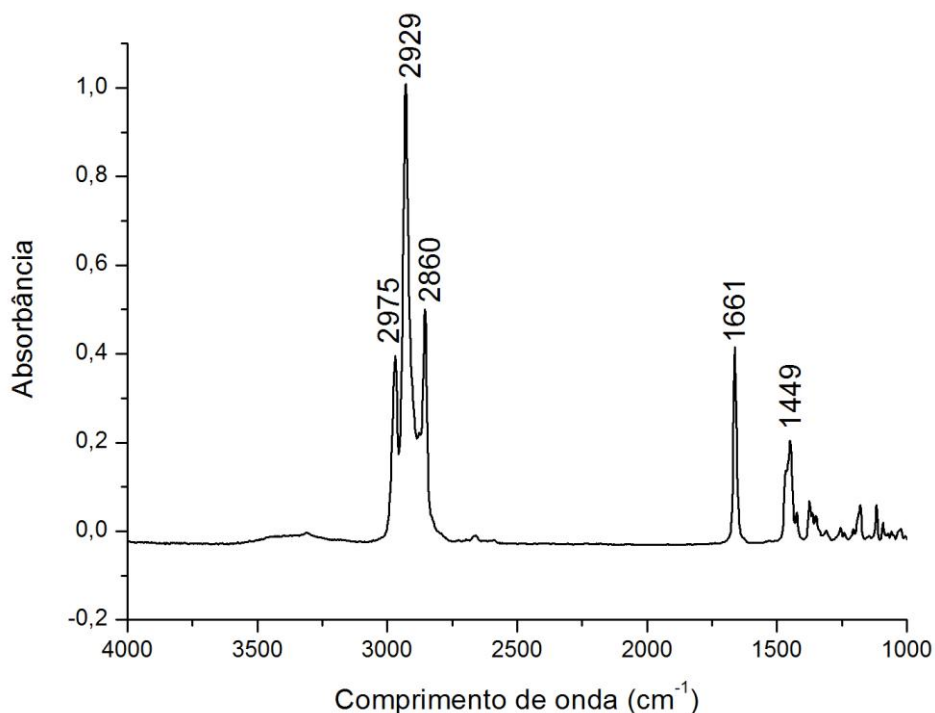


Figura 25. Espectro de infravermelho da *N*-ciclohexil-3-pentaimina **4**.

No espectro de RMN ^1H da *N*-ciclohexil-3-pentaimina (Figura 26) pode-se notar dois tripletos sobrepostos na região δ 1,0 - 1,1 ($J=7,6$ Hz) referente aos seis hidrogênios dos grupos metilas nas posições 1 e 5, há também sobreposições de sinais gerando multipletos na região δ 1,1 - 1,8 referente aos hidrogênios metilênicos nas posições 7, 8, 9, 10 e 11 do ciclo, pode-se observar também dois quartetos na região δ 2,1 - 2,3 ($J=7,6$ Hz) referente aos dois grupos metilenos da cadeia nas posições 2 e 4, totalizando 4 H. Também foi possível observar um multipletto na região δ 3,2 - 3,3 referente ao hidrogênio da metenila na posição 6 ligada ao nitrogênio.

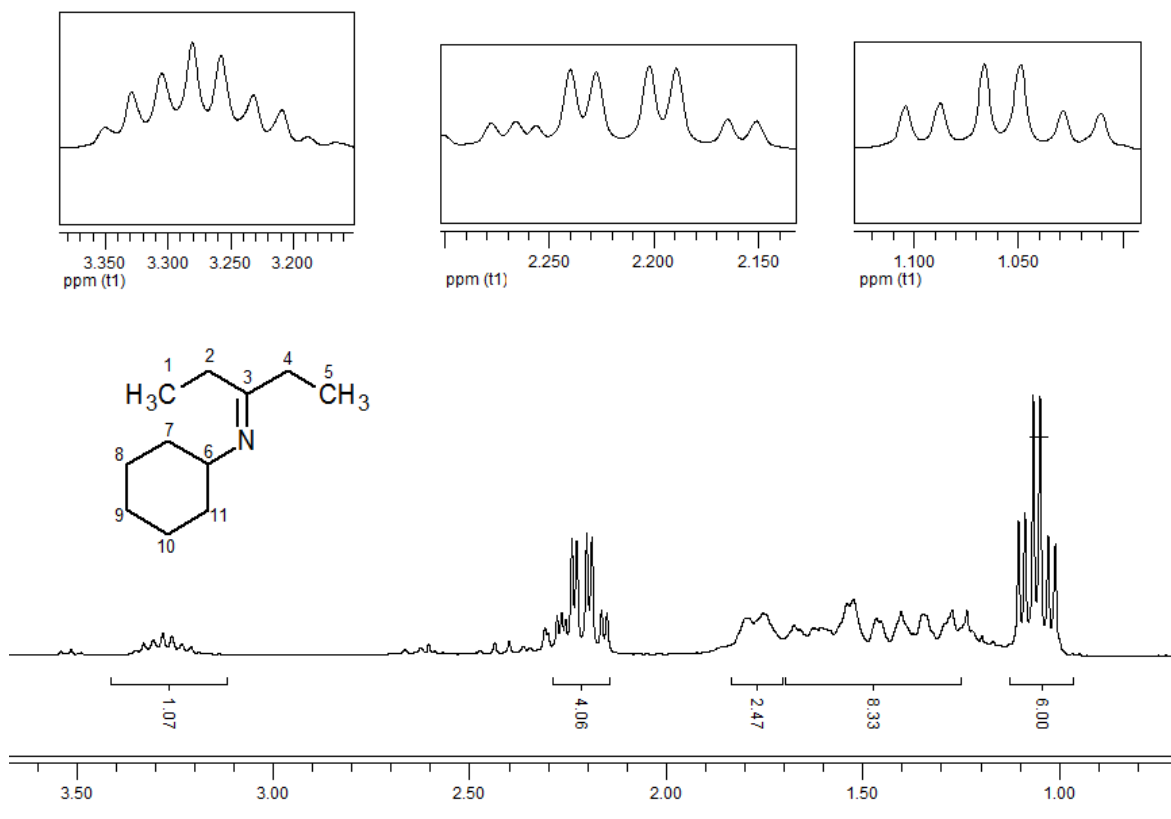


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H da *N*-ciclohexil-3-pentaimina **4** (CDCl_3).

No RMN de ^{13}C (Figura 27), pode ser observada a presença do sinal característico do carbono C3 ligado ao nitrogênio com uma dupla ligação em δ 170, 1 ppm, assim como o sinal em δ 55, 9 que representa o deslocamento do carbono metenila C6 do anel que está ligado ao nitrogênio. O deslocamento em δ 31,5 simboliza os carbonos C7 e C11, o deslocamento em δ 23,3 representa os carbonos C8 e C10 do anel. Pode ser observado também os sinais em δ 22,4 referente ao C9 e em δ 20, 6 referente aos C2 e C4 e, por fim, o deslocamento em δ 9,2 referente as metilas C1 e C5.

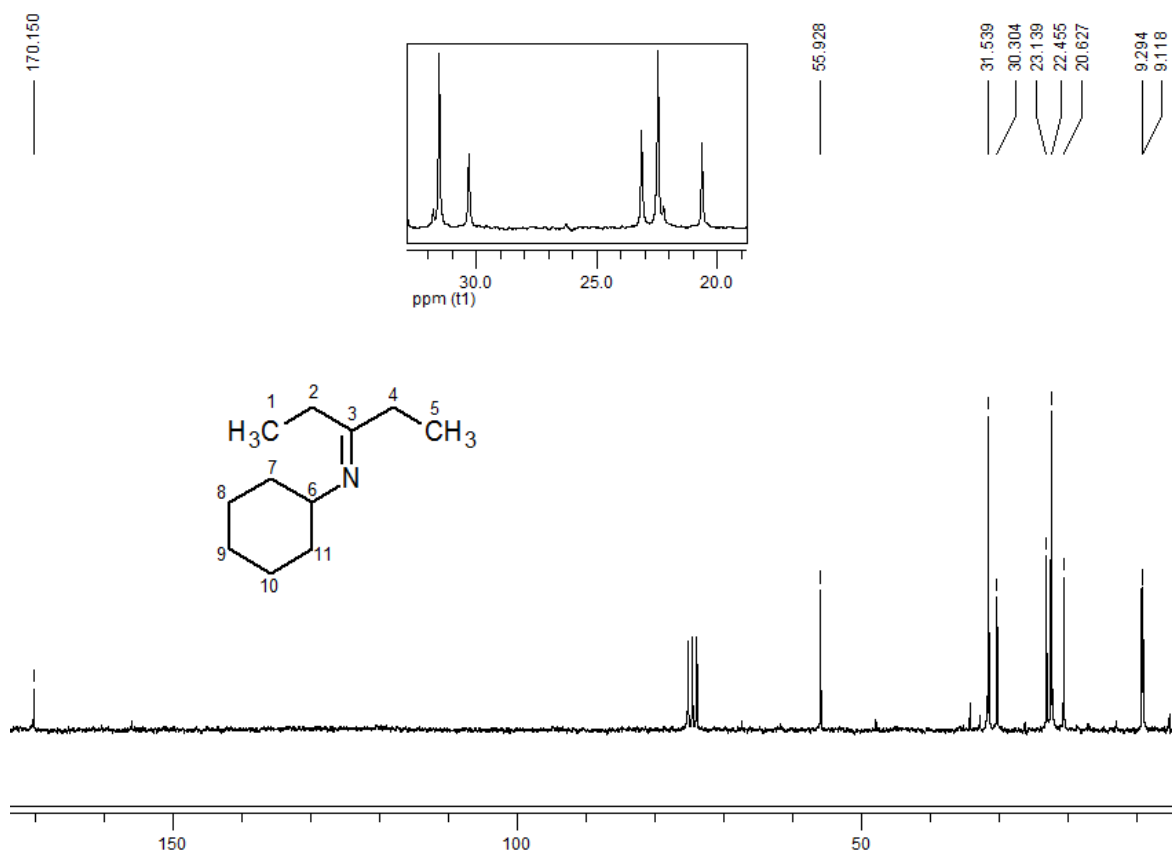


Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C da *N*-ciclohexil-3-pentaimina **4** (CDCl_3).

Através do espectro de RMN de DEPT 135 (Figura 28) pôde-se confirmar a presença de sete CH_2 referentes tanto da cadeia carbônica quanto do anel δ 20,1-34,0 e a presença de uma metila δ 10,0. O deslocamento em δ 58,4 referente ao carbono C6 do anel ligado ao nitrogênio

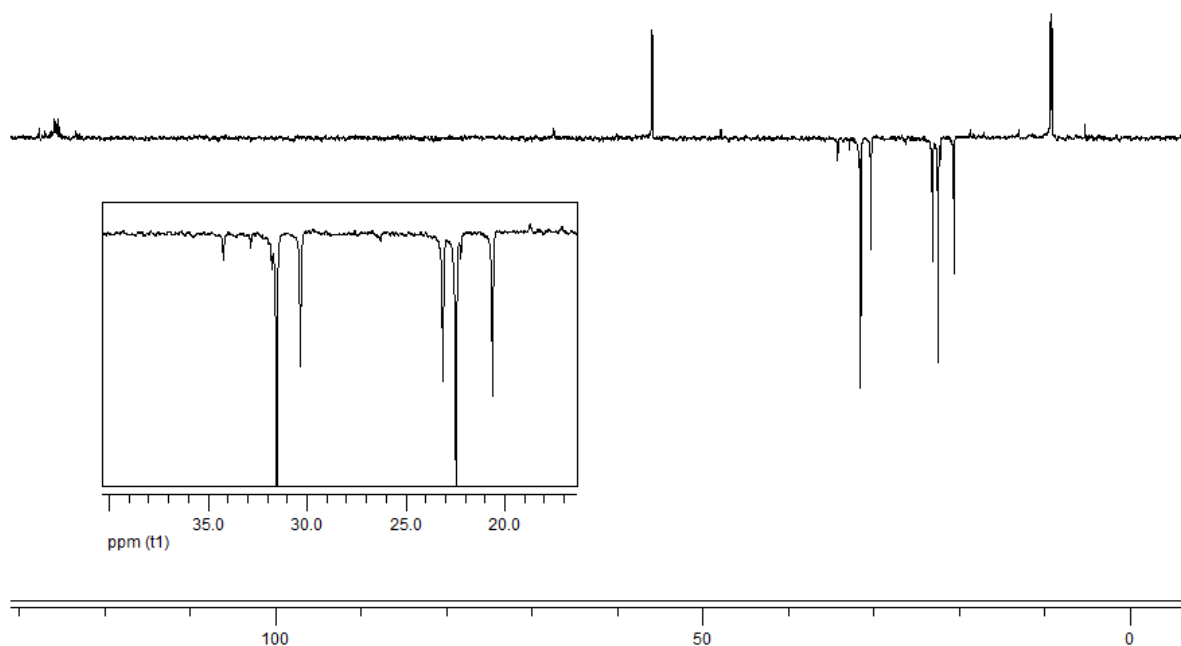


Figura 28. Espectro de RMN de DEPT 135 da *N*-ciclohexil-3-pentaimina **4** (CDCl₃).

A síntese da *N*-ciclohexil-3-pentaimina foi relatada por Suzuki et. al (2004) os quais também partem da reação de uma cetona com uma amina e utiliza como solvente hexano, obtendo o produto final com 94,5% de rendimento. Comparando com o nosso rendimento de apenas 56%, o rendimento maior pode estar associado ao tempo de reação, já que eles deixaram a reação por 24 horas e nós três horas.

Segundo Suzuki et. al (2004), a banda de infravermelho que caracteriza a formação da imina é 1664 cm^{-1} e em nossas análises essa banda foi encontrada em 1661 cm^{-1} , diferindo apenas em três unidades. Quando comparados os deslocamentos de RMN de ^1H com o relatado na literatura há uma certa diferença entre os sinais devido a presença de subprodutos na mistura. Suzuki et. al (2004) relata um multiplete em δ 1,0-1,10 para as metilas na posição 1 e 5, os sinais referentes aos metilenos do anel que não foram possíveis de separar em nossas análises, foram separados pelos autores e descritos como multiplete para os

respectivos hidrogênios. Quando comparado o sinal do hidrogênio na posição 6 são muito próximos, sendo relatado entre 3,05-3,08 ppm. Os deslocamentos de RMN de ^{13}C que caracterizam a formação da imina relatados por eles estão em 172,4 ppm para o C3 e 58,22 ppm para o carbono C6 (SUZUKI, 2004). Comparando os dados de RMN ^1H e ^{13}C relatados na literatura e os encontrados nas análises pode-se observar que os valores foram bem próximos, confirmando assim o sucesso na obtenção da imina.

Na segunda etapa da rota sintética foi utilizada o LDA para formação do ânion correspondente ao composto *N*-ciclohexil-3-pentaimina **4**, tornando-o apto para a condensação com propanal **5**. Após a condensação, a imina foi hidrolisada com ácido acético em água resultando assim como produto final a mistura racêmica da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona **1** (73% de rendimento). O 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona **1** na análise por CG apresentou dois picos, os quais foram denominados como sintético A e sintético B, correspondendo aos dois pares de enantiômeros. Estes apresentaram espectros de massas semelhantes, como pode ser visto na figura 29.

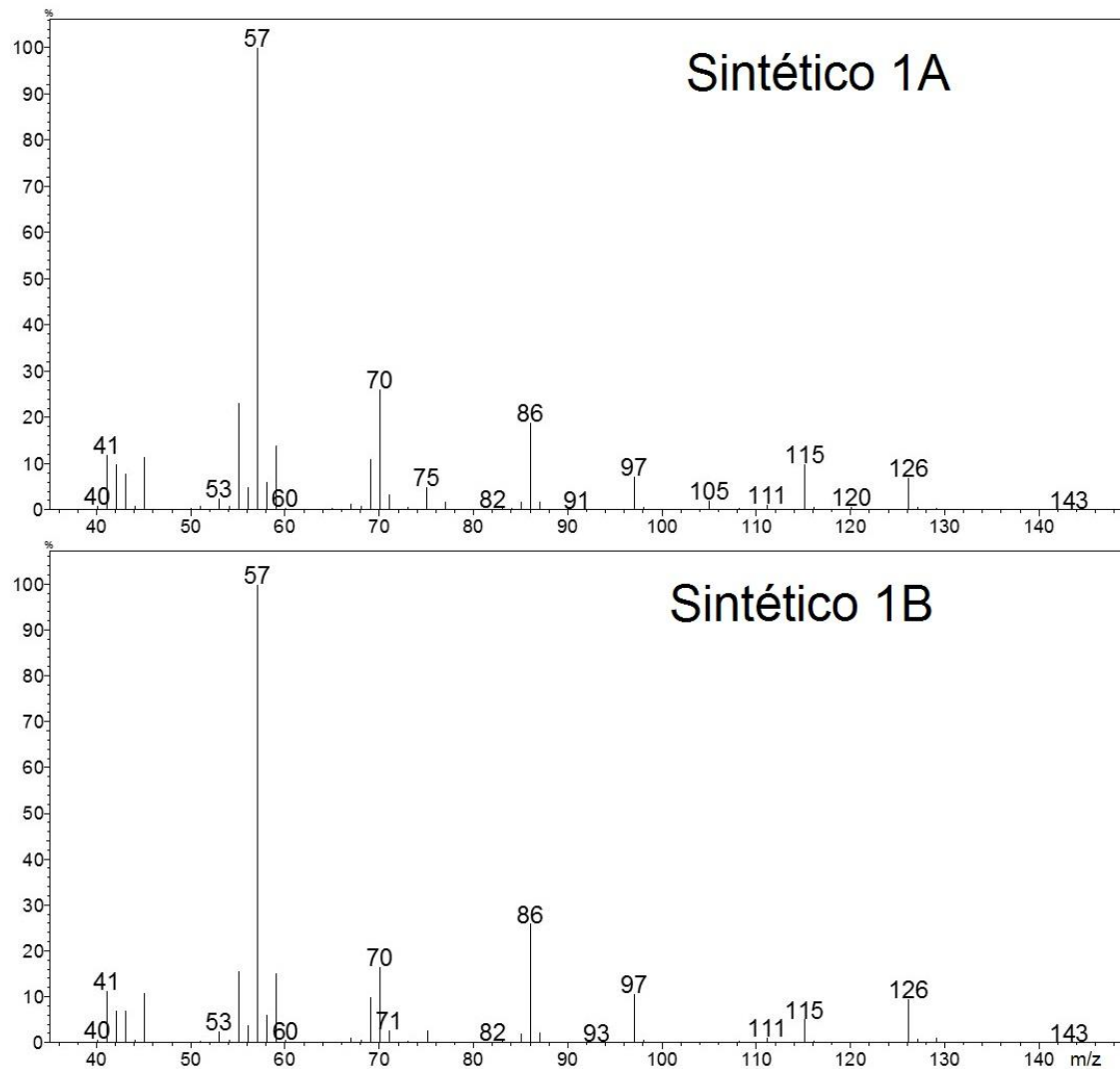


Figura 29. Espectro de massas do sintético da 5-hidroxi-4-metil-3-pentanona 1A e 1 B.

Os espectros de infravermelho obtidos dos dois diastereoisômeros (Figura 30) foram também bem semelhantes, onde as bandas de absorções diferem em poucas unidades, podendo assim, correlacionar as mesmas absorções para os dois.

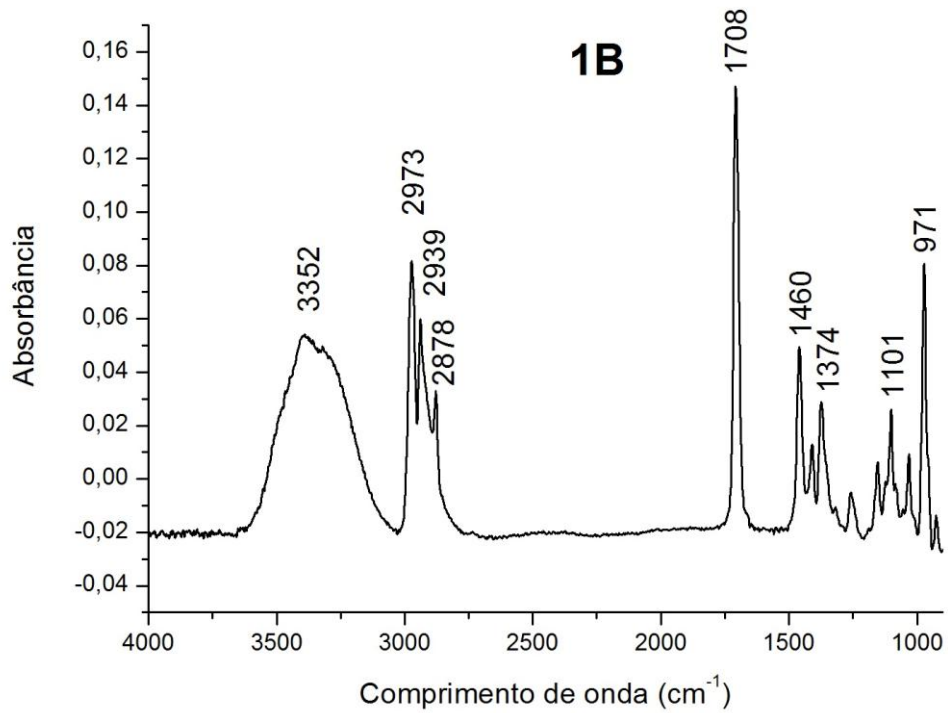
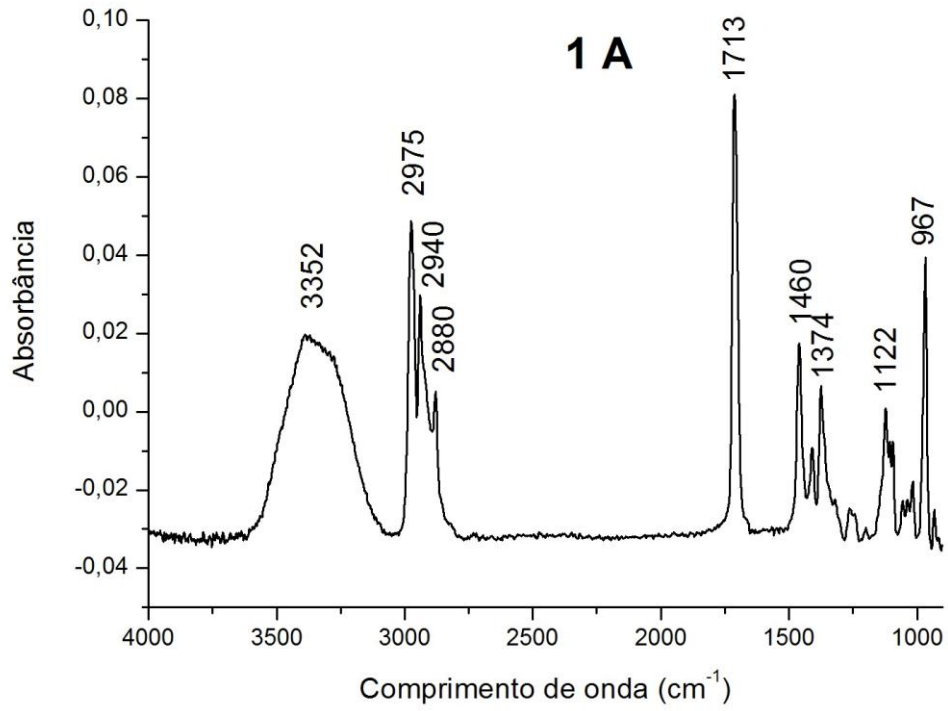


Figura 30. Espectros de infravermelho do 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona 1A e 1B.

A caracterização da mistura racêmica também foi realizada por RMN de ^1H (Figura 31). Alguns sinais dos hidrogênios dos pares de diastereoisômeros se sobrepuseram, assim, foi possível observar um multipeto em δ 3,58-3,88 referente ao hidrogênio carbinólico em C5, o multipeto entre δ 2,2-2,9 referente a sobreposição de sinais dos hidrogênios em C2 e o sinal do hidrogênio em C4, o multipeto em δ 1,4-1,6 referente aos dois hidrogênios em C6 e no deslocamento entre δ 0,95-1,15, pode-se observar um multipeto, correspondendo o sinal de 9 hidrogênios metílicos em C1, C7 e C8.

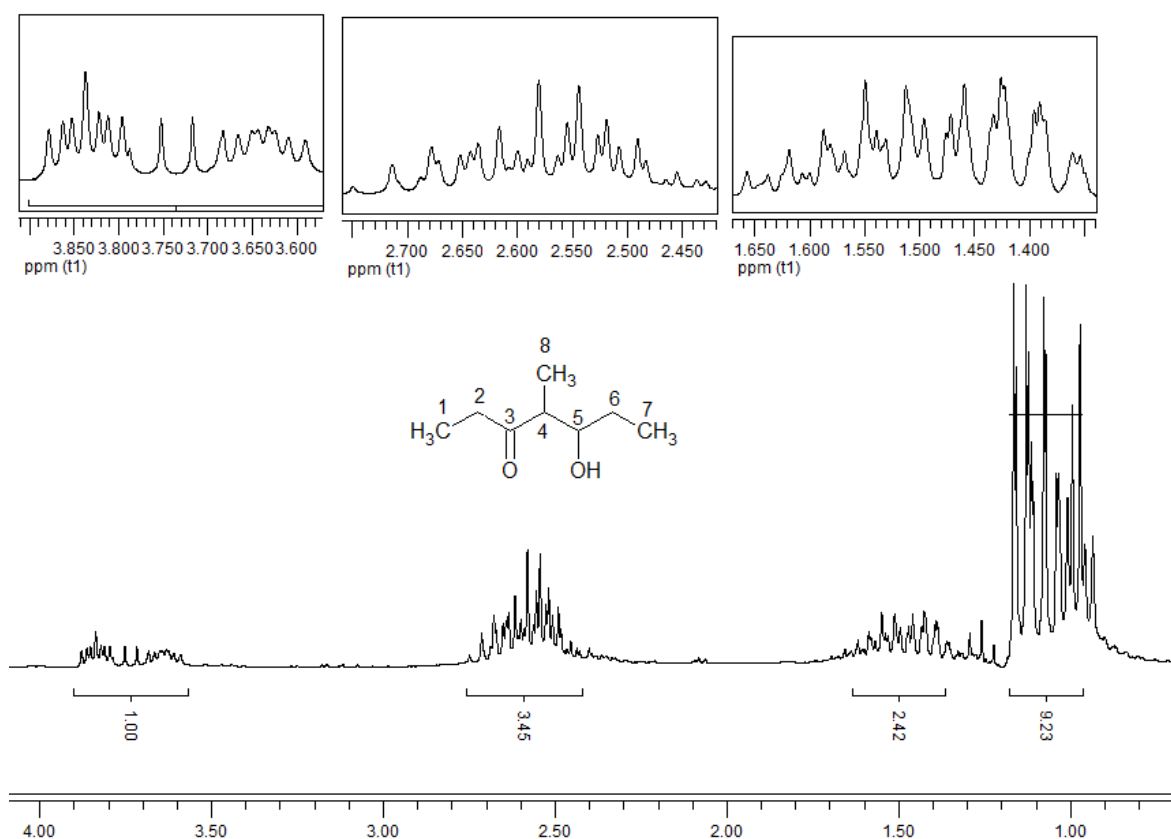


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona racêmica (CDCl_3).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 32), devido a molécula possuir diastereoisômeros alguns sinais foram duplicados. Como pode ser notado no espectro da figura 31, há presença de seis sinais entre δ 7,5-14,2 referentes aos carbonos C1, C7 e C8 e os sinais em δ 26,9 e 27,5 são referentes ao carbono C6. Pode ser observado também sinais em δ 35,1 e 36,0 referente carbono C2, os deslocamentos δ 49,3 e 50,6 referente ao carbono C4, o sinal do carbono carbinólico C5 em δ 72,6 e 75,0 e, por fim, o deslocamento característico da carbonila C3 em δ 216,7.

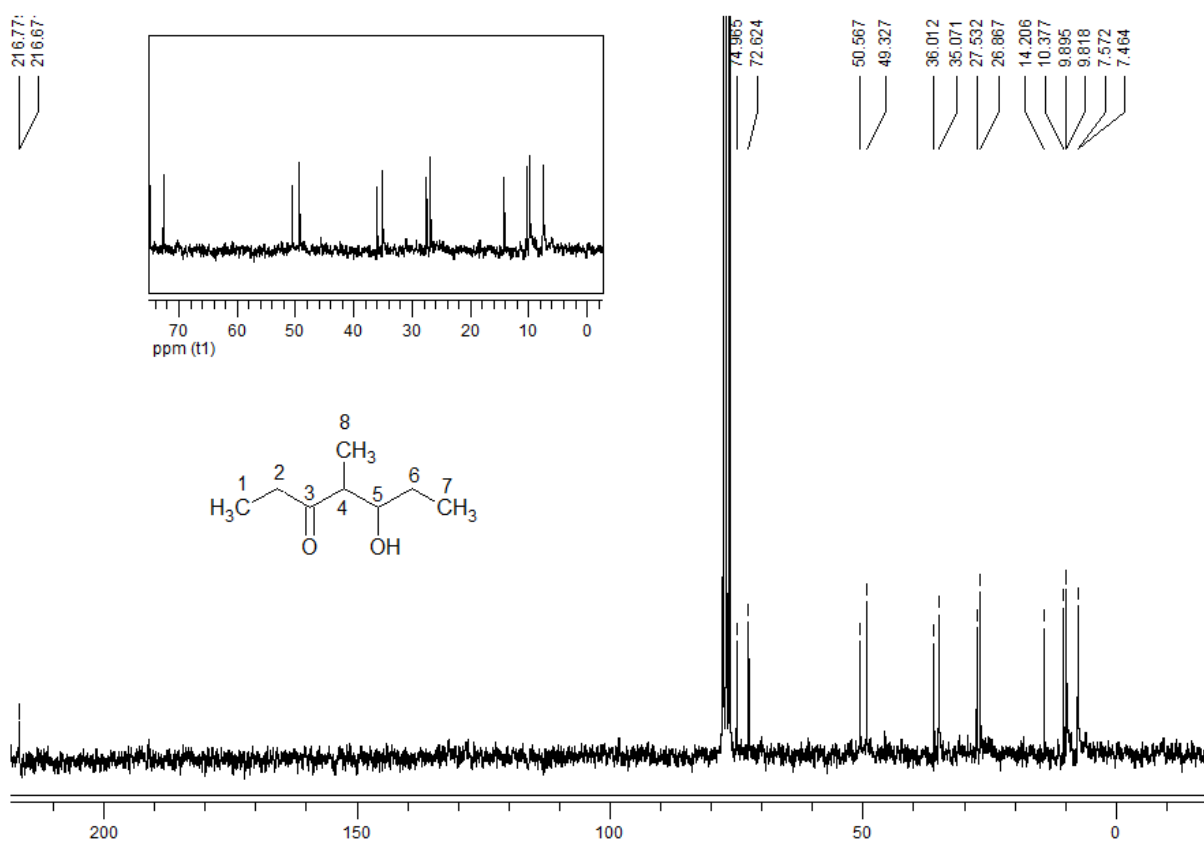


Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona racêmica (CDCl_3).

Não há nenhum relato na literatura de síntese da mistura racêmica do composto 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona. Bohman e Unelius (2009) relataram na síntese dos quatros enantiômeros desse composto, deslocamentos do RMN de ^1H referentes ao hidrogênio carbinólico em C5 entre δ 3,62-3,82, valores bem próximos ao encontrado no padrão sintético racêmico. Os sinais do hidrogênio da hidroxila não foram relatos, e como eles sintetizaram e purificaram cada um dos enantiômeros, conseguiram a separação dos outros sinais que não conseguimos. Na análise do feromônio sintético por RMN de ^{13}C pode-se observar os sinais característicos dos carbonos pertencentes aos grupos funcionais. Bohman e Unelius (2009) relataram deslocamento entre δ 217 para a carbonila C3 e o carbono carbinólico C5 entre δ 72-75 diferindo poucas unidades quando comparado com nossas análises.

Na comparação dos espectros de massas (Figura 33) e infravermelho (Figura 34) do composto sintético 1B com o composto majoritário B, nota-se uma grande similaridade, inclusive para as bandas entre 900 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} no espectro infravermelho, que constituem a “impressão digital “ da molécula (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1998), confirmando que a estrutura atribuída ao feromônio está correta.

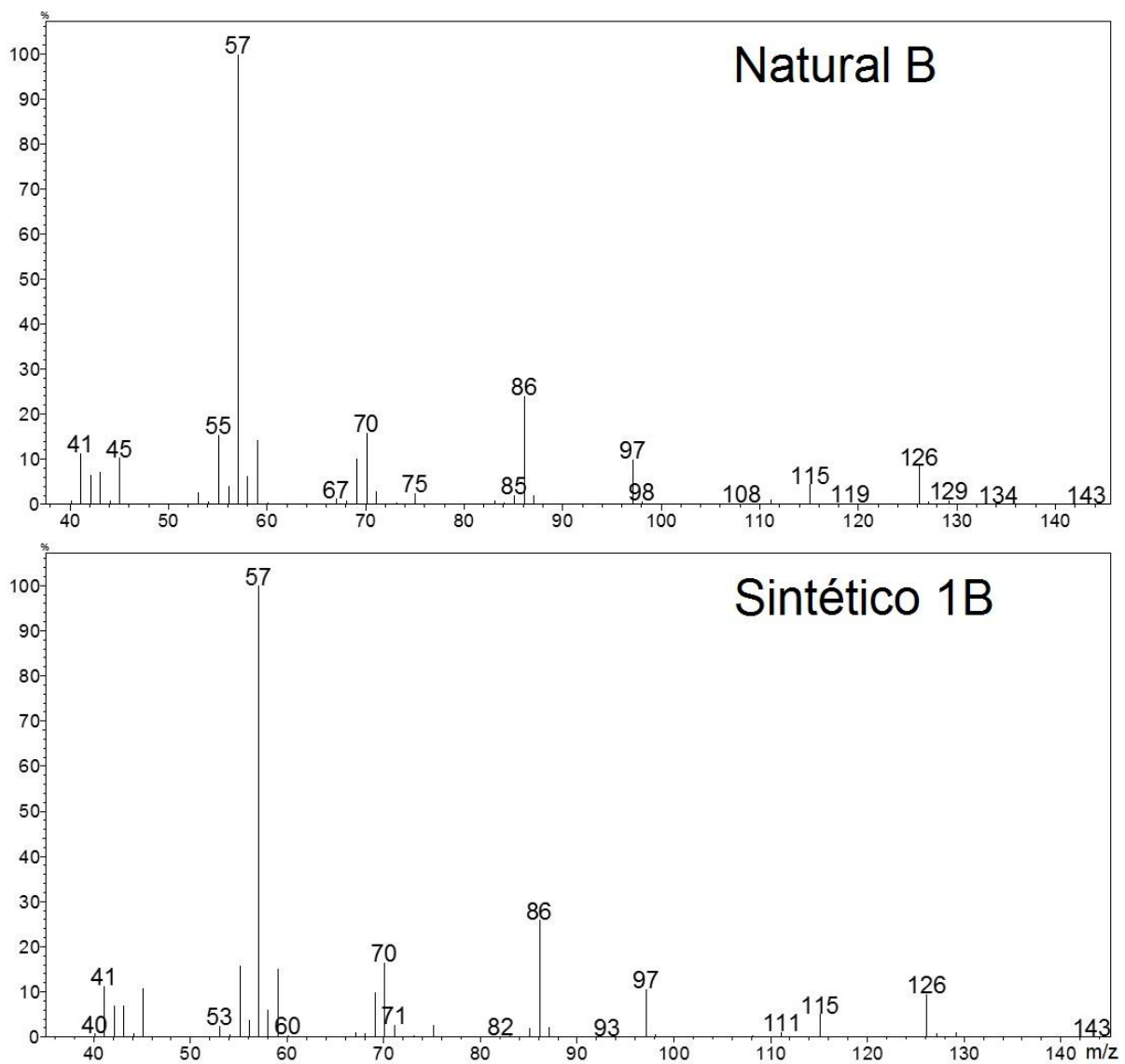


Figura 33. Espectros de massas do composto macho-específico majoritário B produzido por *R. barbirostris* e da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona 1B.

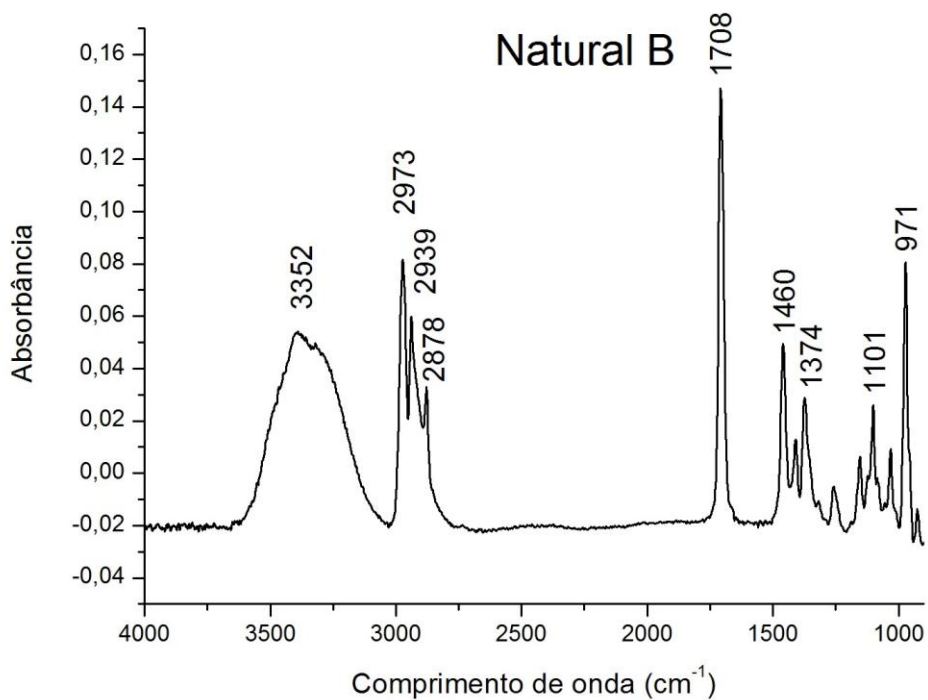
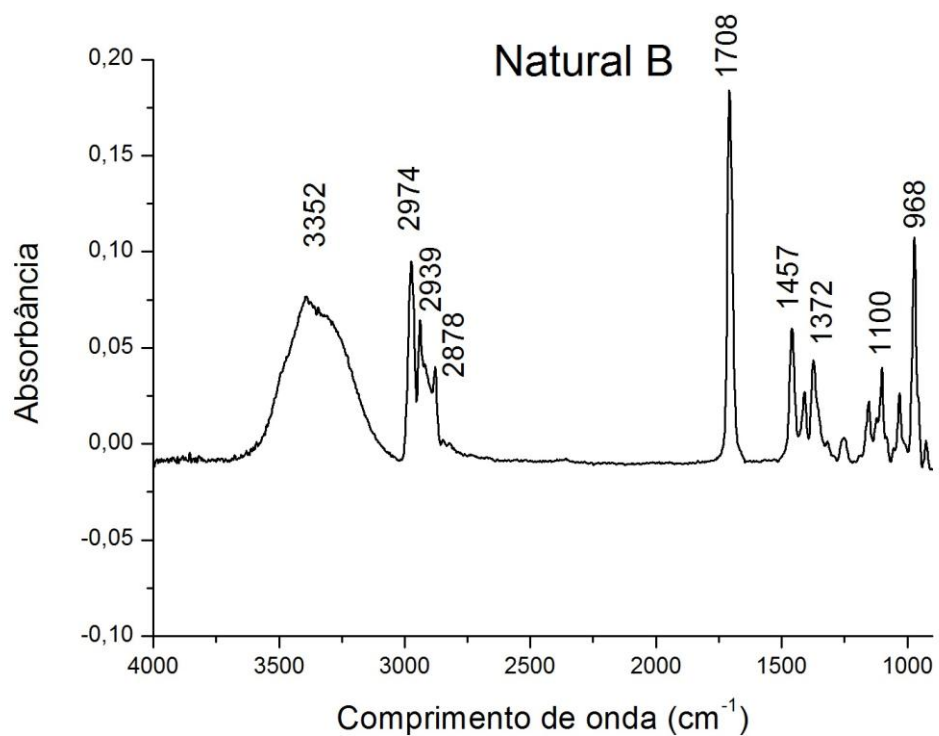


Figura 34. Espectros de infravermelho do composto macho-específico majoritário B produzido por *R. barbirostris* e da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona 1B.

Após a obtenção do composto sintético foi realizada a coinjeção com o produto natural para que a estrutura química proposta para o feromônio fosse comprovada. Tanto o composto majoritário quanto o minoritário co-eluíram com os compostos sintéticos 1A e 1B, confirmando assim a estrutura proposta. Como pode ser observado na figura 35 os compostos sintéticos 1A e 1B possuem o mesmo tempo de retenção que os compostos produzidos pelo macho da espécie *R. barbirostris*.

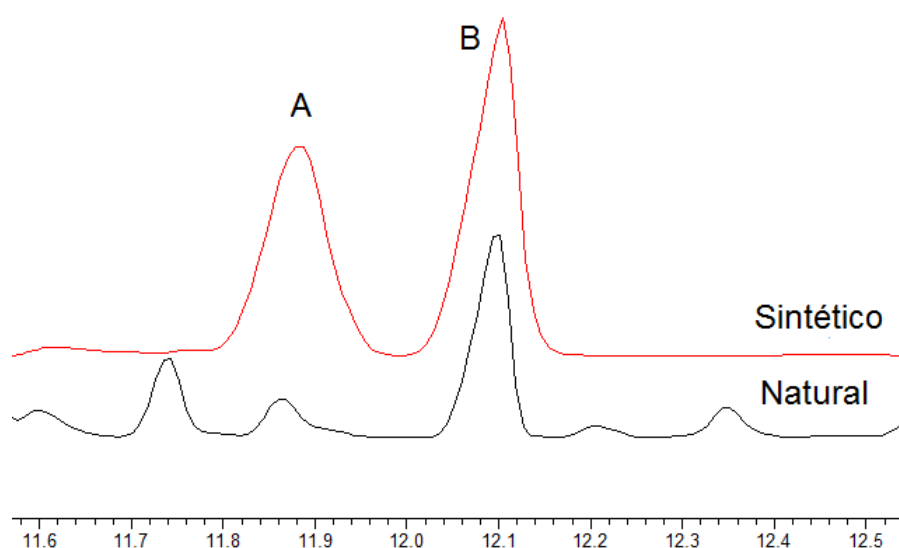
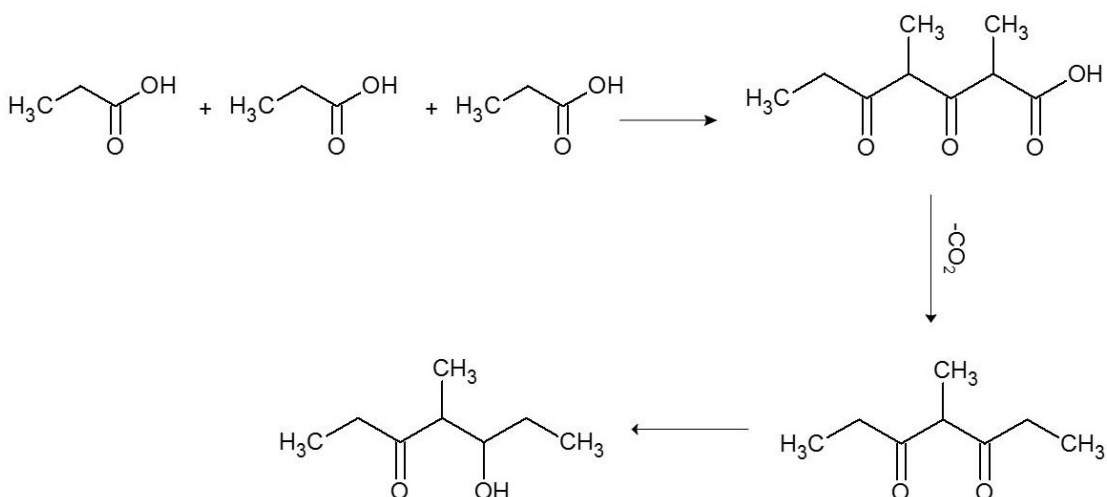


Figura 35. Comparação entre o tempo de retenção da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona 1A e 1B com os compostos produzidos por *R. barbirostris*.

Para muitas espécies a quiralidade dos compostos interfere na atração dos seus coespecíficos. Dentro da família Curculionidae, existem relatos de insetos que são atraídos pela mistura racêmica, como no caso de *Pissodes strobi* e *P. approximatus*, que são capturados por armadilhas contendo a mistura racêmica do grandisol e grandisal (BOOTH, 1983).

Existem também espécies que são atraídas pelos enantiômeros específicos, como no caso da *Conotrachelus humeropictus*, praga de cacau e cupuaçu que mostra atratividade somente para (1*R*, 6*R*)-2,2,6-trimetil-3-oxabicyclo [4.2.0] octan-4-ona (SZCZERBOWSKI et al., 2016). O mesmo acontece com o besouro soldado *Chauliognathus fallax* que é atrativo para o (*Z*)-tricos-11-eno (VIDAL, 2016). Outro exemplo é da espécie *Conotrachelus psidii*, praga de goiaba que é atraído apenas para o (1*R*, 2*S*, 6*R*)-papaynal e a espécie praga de palmáceas *Dynamis borassi*, que demonstrou atratividade para o (4*S*-5*S*)-4-metil-5-nonanol (GIBLIN-DAVIS, 1997), sendo essa mesma mistura usada para captura da espécie *R. ferrugineus* (VACAS, 2014).

Após a confirmação da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona como feromônio de *R. barbirostris*, foi proposta a rota biosintética. A biossíntese dessa molécula ocorre pela condensação de três unidades de propionato, seguida de uma descarboxilação. Após essa etapa, ocorre a redução gerando assim a molécula alvo, como pode ser visto no esquema 2 (MORGAN, 2004).



Esquema 02. Rota biosintética proposta da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona.

Os coleópteros possuem diversas vias bioquímicas, sendo que muitas substâncias produzidas por estes besouros tem como precursores unidades de propionato e acetato. O coleóptero *Carpophilus freemani* possui como maior

componente feromonal o 5-etil-3-metil-2,4,6-nonatrieno e sua biossíntese é realizada através de uma molécula de acetato, uma de propionato e duas de butirato no qual sofrem etapas de condensação, redução do grupo carbonila, entre outras reações até a produção do composto desejado (MORGAN, 2004; PETROSKI et al, 1994).

Com a mistura racêmica da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona, foram realizados testes de campo com 2 tipos diferentes de armadilhas e 4 concentrações do feromônio, a fim de se saber qual tipo de armadilha e a qual concentração teria maior eficácia para a captura de *R. barbirostris*. Como dito anteriormente, alguns feromônios da família Curculionidae se mostram mais eficazes na atração quando associados alguma fonte de alimento, com isso, todas as armadilhas continham cana-de-açúcar junto com a mistura racêmica. Após um intervalo de sete dias as armadilhas foram desfeitas.

Na armadilha de tubo PVC A1 não houve captura de inseto, na armadilha do tipo balde A2 houve captura de *Metamasius hemipterus* e *Rhynchophorus palmarum*, na armadilha A3 tipo balde houve captura apenas de *M. hemipterus* e na armadilha B tipo PVC houve captura de dois *R. barbirostris* macho. O fato de haver captura de *M. hemipterus* e *R. palmarum* nas armadilhas se deu pela presença de atrativos alimentares, no caso os pedaços de cana de açúcar. Moura et al (1997) e Navarro et al (2002) afirmam que o *R. palmarum* tem atração por pedaços de cana de açúcar, estipes de coco e abacaxi, e o mesmo ocorre com o *M. hemipterus* que além de ser uma importante praga de palmáceas, também é praga de cana de açúcar (AMBROGI et al, 2009).

No segundo teste de campo realizado somente com armadilhas do tipo tubo PVC, no qual foram utilizadas quatro armadilhas contendo a mistura do composto sintético e hexano, que foram colocadas em diferentes lugares de uma plantação de coco. Após um período de sete dias as armadilhas foram retiradas para que pudesse ser feito a contagem dos insetos capturados, a tabela abaixo mostra o número de insetos macho e fêmea que foram capturados em cada armadilha.

Tabela 2: Numero de insetos machos e fêmeas capturados em cada armadilha de tubo PVC.

Concentração	Insetos capturados	
	Macho	Fêmea
Solução 200 µL do composto + 200 µL de hexano	13	5
Solução 150 µL do composto + 150 µL de hexano	2	1
Solução 150 µL do composto + 150 µL de hexano	-	-
Solução 150 µL do composto + 150 µL de hexano	1	-

Como pode ser visto na tabela acima, no segundo experimento foi capturado um número maior de insetos, sendo a armadilha de maior concentração a que capturou mais insetos, esse fato se deve a área em que a armadilha foi colocada que além de possuir plantas infestadas possuía também plantas novas.

Segundo o pesquisador Dr. José Inácio Lacerda Moura, em experimentos anteriores utilizando o Rincoforol, ou somente atrativos alimentares nunca houve relatos de captura de *R. barbirostris*, o que torna evidente que a 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona é realmente o feromônio de agregação produzido por esta praga e que a mistura racêmica é atrativa. Dentro da família Curculionidae há casos que as misturas racêmicas apresentam atividade biológica, como exemplo as espécies *R. palmarum*, *R. cruentatus*, *R. phoenicis* e *R. ferrugineus* (OEHLISCHLAGER, 2016; TORRENS, 2015).

6. CONCLUSÕES

Através da coleta dos voláteis pelo método de aeração, foram identificados dois compostos produzidos exclusivamente por insetos machos da espécie *Rhinostomus barbirostris*, importante praga da cocoicultura brasileira. Os extratos que continham estes compostos apresentaram bioatividade, atraindo tanto os indivíduos machos quanto fêmeas, confirmando que estes se tratavam de feromônios de agregação.

Para a elucidação estrutural desses dois compostos foram utilizadas as técnicas de CG-EM e CG-IVTF e, através das análises das fragmentações e absorções presentes nos espectros correspondentes, esses dois compostos foram elucidados como diastereoisômeros da 5-hidroxi-4-metil-3-heptanona, já sendo identificada como feromônio de agregação para as espécies *Sitophilus spp*, pertencente a mesma subfamília do *R. barbirostris*.

A síntese racêmica foi realizada em duas etapas, sendo a confirmação estrutural realizada através da comparação do tempo de retenção entre o composto sintético e os extratos de machos e dos espectros de massas e infravermelho. Os testes em campo com armadilhas do tipo tubo PVC contendo solução do composto sintético e hexano se mostraram eficientes para a captura do *R. barbirostris*.

Em pesquisas futuras poderá ser realizada a separação dos quatro estereoisômeros para que possa ser identificado quais isômeros estão presentes na mistura feromonal e assim determinar os enantiômeros e as proporções produzidos por *R. barbirostris*.

A partir destes resultados, possibilita-se o desenvolvimento da primeira metodologia eficaz de monitoramento e controle de *Rhinostomus barbirostris*, podendo assim aumentar a produção de coco no país e no mundo. Além disso, este trabalho contribui com informações para os bancos de dados das estruturas químicas de feromônios já identificados e com importantes informações sobre a ecologia química da família Curculionidae.

REFERÊNCIAS

AMBROGI, B.G., ZARBIN, P.H.G. Aggregation pheromone in *Sternechus subsignatus* (Coleoptera: Curculionidae): olfactory behaviour and temporal pattern of emission. **J. Appl. Entomol.** n. 132. 2008.

AMBROGI, B.G.; VIDAL, D.M.; ZARBIN, P.H.G.; NETO, G.H.R. Feromônios de agregação em curculionidae (Insecta: Coleoptera) e sua implicação taxonômica. **Quim. Nova.** Vol. 32, Nº. 8, 2151-2158, Out. 2009.

ÁVALOS, J.A., SOTO, A. Study of chromatic attraction of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* using bucket traps. **Bull. Insectology.** p. 83-90, 2015.

BACH, M.F. **Nova metodologia para obtenção de fragmentos quirais presentes em moléculas de feromônios.** 2010. 49 F. Graduação (Química Industrial) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

BARALDI, P.T.; CORRÊA, A.G. O emprego de fermento de pão, *Saccharomyces cerevisiae*, na síntese de feromônios. **Quim. Nova.** Vol. 27, Nº 03, p. 421-431, 2004.

BOARETTO, M.A.A; BRANDÃO, A.L.S. **Utilização de feromônios no controle de praga.** Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2000. Disponível em: <
<http://www.uesb.br/entomologia/ferom.html>>. Acesso em: 13 jan. 2016.

BOHMAN, B.; UNELIUS, C.R. Synthesis of all four stereoisomers of 5-hydroxy-4-methyl-3-heptanone using plants and oyster mushrooms. **Tetrahedron.** V. 65. p. 8697-8701, 2009.

BOOTH, D. C. et al. Aggregation pheromone components of two species of *Pissodes weevils* (Coleoptera: Curculionidae): isolation, identification, and field activity. **J. Chem. Ecology**. Vol. 9, 1983.

DUARTE, A.G. et al. Captura de *Rhynchophorus palmarum* L. (coleoptera: curculionidae) em armadilhas iscadas com o feromônio de agregação e compostos voláteis de frutos do abacaxi. **Rev. Bras. Frutic.** V. 25. n. 1. p. 81-84. Abril, 2003.

DUARTE, A.G.; LIMA, I.S. Ecologia, comportamento e bionomia. Eficiência de diferentes taxas de liberação do feromônio de agregação na captura de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae). **Quim. Nova**. Vol. 30. N°2. 217-221. 2001.

EMBRAPA. **Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional - Panorama 2010**. Aracajú, 2011. 32 f.

EMBRAPA. **Produção e Comercialização de Coco no Brasil Frente ao Comércio Internacional: Panorama 2014**. Aracajú, 2014. 53 f.

FÁVARO, C.F. **Ecologia Química dos percevejos *Agroecus griseus*, *Pallantia macunaima* e *Pellaea stictica* (Heteroptera: Pentatomidae)**. 2012. 206 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

FÁVARO, C.F.; SANTOS, T.B.; ZARBIN, P.H.G. Defensive Compounds and Male-Produced Sex Pheromone of the Stink Bug, *Agroecus griseus*. **J. Chem. Ecology**. Vol.38.1124–1132. Ago. 2012.

FERREIRA, J. M. S. MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS DO COQUEIRO. Centro de Ciências Agrárias Universidade Federal de Alagoas, v. 8, n. 1, p. 21,

2008.

FERREIRA, J.M.S.; FONTES, H.R. Produção integrada de coco: identificação de pragas, doenças e desordem nutricionais e fisiológicas. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias-EMBRAPA. Aracajú, Sergipe. 2006.

FERREIRA, J.M.S. et al. Avaliação de diferentes fontes atrativas e suas prováveis interações na captura de *Rhynchophorus palmarum*. **Manejo Integrado de Pragas y Agroecologia**. Nº. 67 p. 23 - 29, 2003.

FERREIRA, J.M.S. **Proteção fitossanitária do coqueiral: controle de pragas no campo**. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias-EMBRAPA. Aracajú, Sergipe. 1987.

FERREIRA, J.M.S.; FILHO, M.M. A cultura do coqueiro: pragas e métodos de controle. Disponível em: <
<http://sistemasdeprodução.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Coco/ACulturadoCoqueiro/pragas.htm>>. Acesso em: 15 mai. 2015.

FERREIRA, J.M.S.; FONTES, H.R. Produção integrada de coco: Identificação de pragas, doenças e desordens nutricionais e fisiológicas. 1 Ed. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006.

FERREIRA, J.T.B.; ZARBIN, P.H.G. Amor ao primeiro odor: a comunicação química dos insetos. **QNEsc**. Nº 07, Maio, 1998.

FONTENELE, R.E.S.; Cultura do coco no Brasil: caracterização do mercado atual e perspectivas futuras. In: CONGRESSO DA SOBER, 43, 2005, Ribeirão Preto.

FONTES, H. R. F.; WANDERLEY, M. Situação atual e perspectivas para a

cultura do coqueiro no Brasil. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006.

GIBLIN-DAVIS, R.M.G. et al. Chemical and behavioral ecology of palm weevils (Curculionidae: Rhynchophorinae). **Fla. Entomol.** N.79 June, 1996.

GIBLIN-DAVIS, R.M. et al. Aggregation pheromone palm weevil *Dynamis borassi*. **J. Chem. Ecology**. Vol. 23, 1997.

GOULART, H.F; LIMA, M.R.F.; de MORAIS, R.K.S.; BERNARDO, V.B. Feromônios: uma alternativa verde para o manejo integrado de pragas. **R.Vq.** Vol. 07, N° 04, p. 1205-1224, 2015.

JURENKA, R. Insect Pheromone Biosynthesis. **Topics in Current Chemistry** . P. 97–132, 2004.

KHAN, Z. et al. Push-Pull: Chemical Ecology-Based Integrated Pest Management Technology. **J. Chem. Ecology**. p. 689-697, 2016.

LIMA, J.S. et al. Interações tritróficas nos agroecossistemas. **Enciclopédia biosfera, centro científico conhecer**. V.9, N.16. P. 1347-1360, 2013.

MONTEIRO, L.B.; SOUZA, A.; BELLI, L. Confusão sexual para o controle de *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae), em pomares de macieira, em Fraiburgo (SC), Brasil. **Bragantia**. v.67, n.1, p.191-196, 2008.

MORAES, M.C.B. et al. **Eletroantenografia- a antena do inseto como biossensor**. EMBRAPA- Recursos genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2008.

MORAES, M.C.B; SOUSA, L.M.P.; LAUMANN, R.; Borges, M.. **Metodologia para estudos de semioquímicos e a sua aplicação no manejo de pragas. A influencia de voláteis de soja no comportamento do parasitoide**

Telenomus podisi. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias-EMBRAPA. Brasília, 2013.

MOREIRA, M.A.B.; ZARBIN, P.H.G.; CORACINI, M.D.A. Feromônios associados aos coleópteros-praga de produtos armazenados. **Quim. Nova**. Vol. 28, N^o. 3, 472-477, Fev. 2005.

MORGAN, E.D. Biosynthesis in insects. **Royal Society of Chemistry**. 225 p., 2004.

MORI, KENJI. Chirality and insects pheromones. **Chirality**. Vol. 10, 578–586, 1998.

MOURA, J.I.L. et. al. Captura de *Rhynchophorus palmarum* (L.) pelo Uso de Feromônio de Agregação Associado a Árvore-Armadilha e Inseticida. **An. Soc. Entomol. Brasil**.V.26. N. 01. P. 69-73, 1997.

MUHLEN, C.V. Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. **Scientia Chromatographica**. V.1. N. 03. P. 21-29, 2009.

NAVARRO, D.M.A.F.; MURTA, M.M.; DUARTE, A. G.; LIMA, I.S.; NASCIMENTO, R.R.; SANT'ANA, A.E.G. Aspectos práticos relacionados ao uso do Rincoforol, o feromônio de agregação da Broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (coleoptera: curculionidae) no controle de pragas do coqueiro. Análise de sua eficiência em campo. **Quim. Nova**. Vol 25. N^o 1. São Paulo, 2002.

OEHLISCHLAGER, A.C. Palm weevil pheromones – discovery and use. **J. Chem. Ecology** . P. 617-630, July, 2016.

PEREZ, A.L. et al. Aggregation pheromones and host kairomones of west

indian sugarcane weevil, *Metamasius hemipterus sericeus*. . **J. Chem. Ecology**. Vol. 23. N. 4, 1997.

PETROSKI, R.J. et al. Biosynthesis of (2*E*,4*E*,6*E*)-5-Ethyl-3-Methyl-2.,4,6-Nonatriene: the Aggregation Pheromone of *Carpophilus freemani* (Coleoptera: Nitidulidae). **Insect Biochem. Molec. Biol.** V. 24. N. 1. P. 69-78, 1994

PHILLIPS, J.K. et al. (R*,S*)-5-hydroxy-4-methyl-3-heptanone Male-Produced Aggregation Pheromone of *Sitophilus oryzae* (L.) and *S. zeamais* Motsch. **J. Chem. Ecology**. Vol. 11, N. 9, 1985.

PINTO, A.C. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**.Vol. 25, P. 45-61, 2002.

RIATTO, V.B. **Síntese quimioenzimática de (-)- serricornina e (+) – Sitofilure**. 1997. 191 f. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

ROCHAT, D. et al. Role of solid-phase microextraction in the identification of highly volatile pheromones of two Rhinoceros beetles *Scapanes australis* and *Strategus aloeus* (Coleoptera, Scarabaeidae, Dynastinae). **J. Chromatogr. A**. p. 433 –444, 2000.

SANTOS, G.B.S. **Coleópteros-praga, inimigos naturais e polinizadores associados à dendenzeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) e piaçaveiras (*Attalea funifera* Mart.) (Arecaceae) em municípios da região sul da Bahia**. 2016. 87f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)- Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2016.

SILVA, A.G. et al. Interação tritrófica: aspectos gerais e suas implicações no manejo integrado de pragas. **Nucleus**. V.9. N.1. P. 35-47, .2012.

SILVA, C.A.D. Feromônios para o Controle de Pragas do Algodoeiro. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias-EMBRAPA. Campina Grande, 2002.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois S.A., 1998.

SUZUKI, K. et Al. Role of cyclic dithiocarbonate as a promoter in the reaction of epoxide and imine in the presence of water. **J. Polym. Sci. A Polym. Chem.**, Vol. 42, p. 4276–4283, 2004.

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 Lett.** p. 2842–2844, 2016.

SZCZERBOWSKI, D. **Síntese total de produtos naturais isolados de *Edessa mediatunda* (Hemiptera: Pentatomidae) e *Eleutherodactylus iberia* (Anura: Eleutherodactylidae)**. 2016. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

THOMAZINI, M. J. **A comunicação química entre os insetos: obtenção e utilização de feromônios no manejo de pragas**. Embrapa Acre: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2009. cap. 17, p. 338-354.

TILLMAN, J.A. Insect pheromones an overview of biosynthesis and endocrine regulation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** . P. 481–514, 1999.

TORRENS, G.G. **Feromônio de *Conotrachelus humeropictus* fiedler, 1940**

(Coleoptera: Curculionidae): identificação estrutural e avaliação da atividade comportamental. 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

TRAMMEL, K.; ROELOFS, W.L.; GLASS, E.H. Sex-Pheromone Trapping of Males for Control of Red banded Leafroller in Apple Orchards 12. **J Econ Entomol.** V.67. P.159-164, 2014.

TURCHIN, P.; ODENDAAL, F.J. Measuring the Effective Sampling Area of a Pheromone Trap for Monitoring Population Density of Southern Pine Beetle (Coleoptera: Scolytidae). **Environ Entomol.** V. 25. P. 582-588, 2014.

VACAS, S. et al. Identification of pheromone synergists for *Rhynchophorus ferrugineus* trapping systems from phoenix canariensis palm volatiles. **J. Agric. Food Chem.** p. 6053-6054, 2014.

VIDAL, D.M. et al. Identification and Synthesis of the Male-Produced Sex Pheromone of the Soldier Beetle *Chauliognathus fallax* (Coleoptera: Cantharidae). **J. Braz. Chem. Soc.** Vol. 27, N^o. 8, p. 1506-1511, 2016.

VILELA, E.F., LUCIA, T.M.D. **Feromônio de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas.** 2 ed. Editora: Hollus, 2001.

WIBE. A. et al. Combining 1,4-dimethoxybenzene, the major flower volatile of wild strawberry *Fragaria vesca*, with the aggregation pheromone of the strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi* improves attraction. **Crop Prot.** N.64. p. 122-128, 2014.

ZARBIN, P.H.G.; CORREA, A. **Feromônios contra as pragas.** Revista Eco 21. Ed. 37. Disponível em: <
<http://www.eco21.com.br/textos/textos.asp?ID=901>>. Acesso em: 25 mai. 2016.

ZARBIN, P.H.G.; FERREIRA, J.T.B.; LEAL, W. S. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Quim. Nova.** Vol. 22, N°1, 1999.

ZARBIN, P.H.G.; RODRIGUES, M.A.C.M; LIMA, E.R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Quim. Nova.** Vol. 32. N° 3, São Paulo, 2009.

ZEVALHOS, D.M.P.; ZARBIN, P.H.G. A química na agricultura: perspectivas para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis. **Quim. Nova.** Vol. 36. N° 10, 1509-1513, 2013.