

2.05.99 – Ecologia

ATRAÇÃO DE FÊMEAS DE *Anastrepha obliqua* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) PARA FORMULAÇÕES DE COMPOSTOS ELETROFISIOLOGICAMENTE ATIVOS NO FEROMÔNIO DE MACHOS.

Nathaly C. de Aquino¹; Luana L. Ferreira¹; Raphael de F. Tavares²; Claudinete S. Silva³; Adriana de L. Mendonça⁴; Fabiane C. de A. Galdino⁵; Paulo Milet- Pinheiro⁶; Daniela M. do A. F. Navarro⁷; Ruth R. do Nascimento^{5,8}

1. Doutoranda - Renorbio
2. Doutorando- PPGQB-UFAL
3. Mestre em Química e Biotecnologia - PPGQB-UFAL
4. Profª Dra. - Centro Universitário Tiradentes
5. Profª Dra. Instituto de Química e Biotecnologia - UFAL
6. Pesquisador (PNPD) - Departamento de Botânica da UFPE
7. Profª Dra. - Departamento de Química Fundamental da UFPE
8. Orientadora

Resumo:

Dentre as espécies de mosca das frutas que causam prejuízos à fruticultura brasileira, por ocasionar queda precoce e depreciação de frutos, encontra-se a espécie de *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). Devido ao impacto desta praga, o presente estudo objetivou avaliar a atratividade de fêmeas de *A. obliqua* a formulações de compostos eletrofisiologicamente ativos presentes no feromônio liberado por machos através da técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Eletroantenografia. Os resultados demonstraram que cinco compostos eliciam resposta atrativa nas fêmeas e pelo uso da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, os compostos identificados foram: 1-heptanol, linalol, (Z)-3-nonen-1-ol, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno. Posteriormente, bioensaios em arena, contendo seis diferentes misturas, demonstraram a atratividade de fêmeas. Esta pesquisa é importante para compreender e propor novos produtos derivados de semioquímicos para o controle da praga *A. obliqua*.

Palavras-chave: Moscas das frutas do Oeste indiano; Eletroantenografia; Semioquímicos

Apoio financeiro: CAPES; CNPq; IQB-UFAL; RENORBIO

Introdução

Atualmente a produção sustentável de frutas é um dos principais desafios ligados à fruticultura, principalmente devido ao uso de pesticidas organosintéticos de amplo espectro para o controle de insetos praga. Esses produtos são nocivos para o meio ambiente e seres humanos e quando usados indiscriminadamente, como é o caso do Brasil, torna o país o maior consumidor de produtos agrotóxicos no mundo (MMA, 2017). Uma das pragas que vem sendo combatida com o uso de agrotóxicos no Brasil é a mosca das frutas que geram prejuízos na ordem de US\$ 120 milhões ao ano entre colheita, controle e comercialização (TREICHEL *et al*, 2016). No âmbito mundial, o país é responsável por 10% dos prejuízos causados por tefritídeos (FAO, 2010).

Dentre as espécies de moscas das frutas, *Anastrepha obliqua* (Macquart) é conhecida devido a sua polifagia, atacando uma variedade de 49 espécies de frutos, principalmente os da família *Anacardiaceae* (NORRBOM & KIM, 1988; MALAVASI *et al.*, 2000). A comunicação química para esta espécie ocorre quando os machos liberam o feromônio de agregação/sexual, que atrai machos e fêmeas respectivamente. Após o acasalamento, as fêmeas realizam a oviposição e posteriormente as larvas se alimentam da polpa do fruto, tornando-os inviáveis para o consumo *in natura* e comercialização. Uma alternativa para o manejo destes insetos é o controle por comportamento através de semioquímicos, que atuam em quantidades extremamente pequenas, e não são tóxicos, propiciando benefício ao produtor e consumidor (VILELA & MAFRA-NETO, 2001). Existem registros de produtos como atraentes alimentares e feromonais, para moscas das frutas de diferentes espécies no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), mas até o presente momento, não há registros em bases patentárias referentes aos atraentes para *A. obliqua* baseados em compostos voláteis oriundos do feromônio sexual.

Dada à importância dos semioquímicos no biocontrole de insetos-praga, o presente estudo objetivou avaliar a atratividade das formulações de compostos eletrofisiologicamente ativos na mistura feromonal de machos de *A. obliqua* através das técnicas de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e de Cromatografia Gasosa acoplada à Eletroantenografia (CG-EAD), que sejam atraentes para fêmeas. Verificando assim, quais formulações podem contribuir para o conhecimento dos hábitos reprodutivos dos insetos e possivelmente ser empregada em produtos para o controle da espécie de *A. obliqua*.

Metodologia:

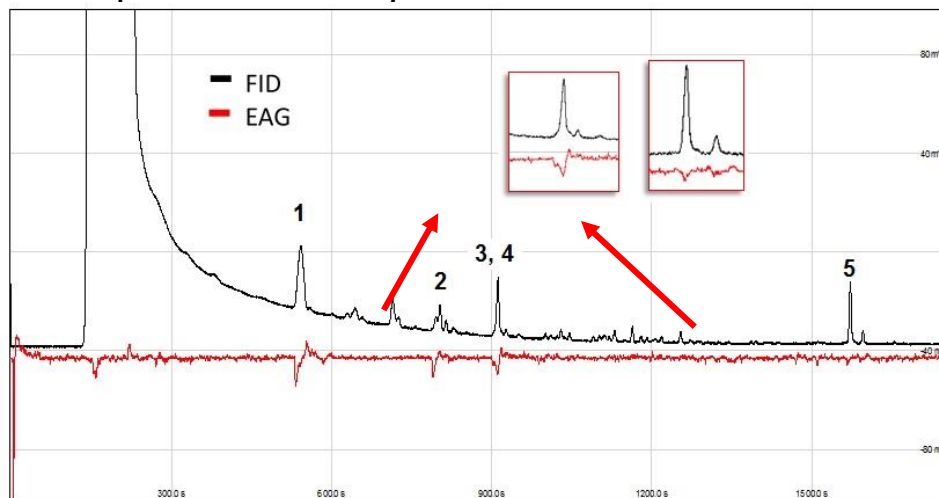
As larvas de *A. obliqua* foram obtidas a partir de coletas de frutos infestados realizadas em pomares no município de Maceió/AL, posteriormente os frutos foram acondicionados em gaiolas de isopor e mantidos em condições semi-campo. Após a emergência, os insetos foram mantidos em gaiolas de criação contendo dieta artificial, água e frutos de goiaba que serviram como substrato de oviposição. O extrato do feromônio de 50 machos foi obtido pela técnica de aeração que consiste em um fluxo de ar que purga as substâncias voláteis, emitidas pelos insetos para um *trap* contendo polímero adsorvente (Tenax®). A determinação dos compostos eletrofisiologicamente ativos no feromônio foi conduzida no CG-EAD empregando-se 1,0 µL das amostras injetada sob o modo splitless e fêmeas com idade entre 10-20 dias. A identificação dos compostos EAD ativos nos extratos do feromônio foi realizada no CG-EM através da co-injeção com padrões sintéticos e comparação de seus espectros de massas e tempos de retenção disponíveis nas bibliotecas NIST08 e Adams.

As formulações testadas nos bioensaios foram preparadas a partir dos padrões sintéticos adquiridos comercialmente (*Sigma-Aldrich*; grau de pureza $\geq 98,5\%$). As soluções foram microencapsuladas em um biopolímero através de adsorção por contato 24h antes dos bioensaios resultando na dose de 0,1 ng. A atratividade das formulações, foi avaliada em testes de dupla escolha, onde foram testados os compostos individuais: 1-heptanol, linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno, na proporção encontrada nos extratos de machos 95:0,7:1,5:1,5:1,5 respectivamente, frente ao extrato do feromônio (controle positivo) e posteriormente as seguintes misturas: **A** (1-heptanol, linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno), **B** (1-heptanol, linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol e (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol), **C** (1-heptanol, linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol e α -farneseno), **D** (1-heptanol, linalol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno), **E** (1-heptanol, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno) e **F** (linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno). O controle negativo (*ependorff* com substrato) também foi avaliado em bioensaios de dupla escolha frente ao controle positivo.

Os testes de dupla escolha foram conduzidos no período das 14:00h-16:00h, em arenas de vidro onde os dois eppendorfs contendo as formulações foram pendurados equidistantemente. Nestes testes foram utilizados grupos de seis fêmeas marcadas com tinta atóxica, observando-se o comportamento de atração durante 20 min. Os dados obtidos atenderam aos padrões de normalidade e homogeneidade, permitindo a aplicação do teste *t* de *Student* ($p < 0.05$) através do software *Assistat 7.7*.

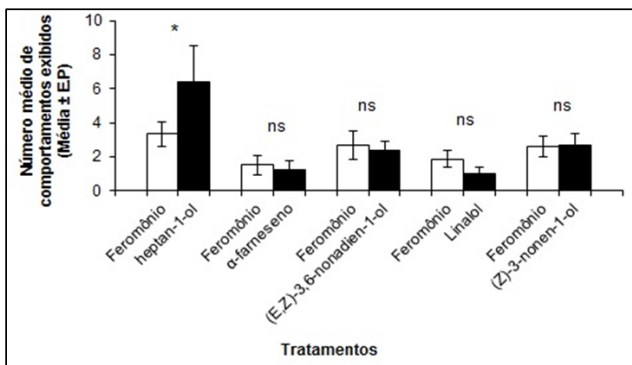
Resultados e Discussão:

As análises por CG-EAG, com fêmeas de *A. obliqua* e extratos do feromônio de machos coespecíficos, revelaram cinco compostos eletrofisiologicamente ativos, dos quais quatro são álcoois: **(1)** 1-heptanol, **(2)** linalol, **(3)** (*Z*)-3-nonen-1-ol e **(4)** (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e um sesquiterpeno, **(5)** α -farneseno (**Figura 1**). Dentre estes compostos ativos, alguns já foram reportados como pertencentes a outras espécies de moscas das frutas como é o caso dos compostos (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno que foram EAD ativos para fêmeas de *A. fraterculus* (MILET-PINHEIRO *et al.*, 2015). Semelhantemente, os álcoois linalol e 3,6-nonadien-1-ol foram reportados como EAD-ativos para *Bactrocera invadens* e para a espécie de *Anastrepha striata* foi reportado a atração para o composto linalol (BIASAZIN *et al.* 2014; CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2015). Além disso, Linz *et al.* (2013) demonstraram que 2-heptanona e o linalol estimularam respostas antenais em quatro espécies de moscas pertencentes ao gênero *Drosophila*: *D. melanogaster*, *D. yakuba*, *D. orena* e *D. erecta*. Desta forma, percebe-se que os componentes identificados como eletrofisiologicamente ativos, desempenham papel fundamental na comunicação química por serem reconhecidos por diversas espécies de moscas das frutas que são consideradas pragas de importância econômica no Brasil e em outros países.

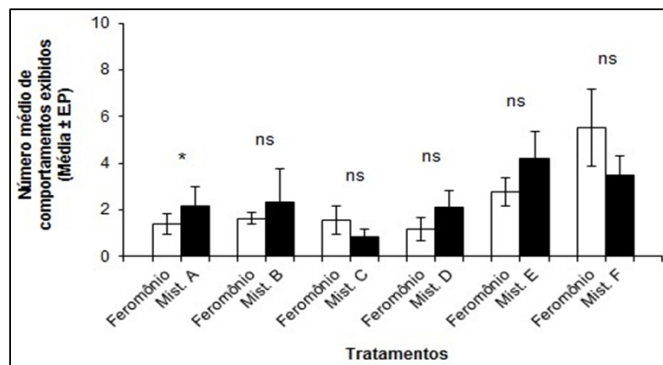
Figura 1 - Identificação de compostos EAD-ativos na mistura feromonal liberada por machos de *A. obliqua*

Nota: (1) – 1-heptanol; (2) – linalol; (3) – (*Z*)-3-nonen-1-ol; (4) – (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol; (5) - α -farneseno. FID: detector de ionização de chamas; EAG: Eletroantenografia

Nos bioensaios com compostos individuais, todos os tratamentos avaliados desencadearam resposta comportamental nas fêmeas, porém, as respostas para as formulações do α -farneseno, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol, linalol e (*Z*)-3-nonen-1-ol foram semelhantes as exibidas para o extrato de machos coespecíficos. As fêmeas foram mais atraídas para a formulação contendo o 1-heptanol, cuja resposta diferiu significativamente do tratamento controle pelo teste *t* de Student com $p < 0,05$ ($t = 2,1554$, $GL = 15$) (Figura 2). No caso das misturas B, C, D, E e F foram preparadas com o intuito de verificar o efeito de redundância entre compostos, para tanto, foi retirado de cada mistura um componente. Os resultados obtidos demonstraram que fêmeas de *A. obliqua* foram atraídas para todas as misturas testadas, com atração comparável a exibida para o feromônio de machos. Apenas a mistura A, contendo todos os componentes identificados como EAD ativos, apresentou diferença estatística significativa quando comparada a resposta de fêmeas ao extrato de machos de acordo com o teste *t* de Student com $p < 0,05$ ($t = 3,08118$, $GL = 15$) de acordo com a Figura 3.

Figura 2 – Atratividade de fêmeas virgens de *A. obliqua* para soluções de compostos individuais frente ao feromônio de machos.

Nota: (*) diferença estatística significativa ao nível de 5% de probabilidade. ns – indica ausência de diferença estatística significativa pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

Figura 3 – Atratividade de fêmeas virgens de *A. obliqua* para misturas das soluções dos compostos sintéticos frente ao feromônio de machos.

Nota: A (1-heptanol, linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno), B (1-heptanol, linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol e (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol), C (1-heptanol, linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol e α -farneseno), D (1-heptanol, linalol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno), E (1-heptanol, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno) e F (linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno). (*) diferença estatística significativa ao nível de 5% de probabilidade. ns – indica ausência de diferença estatística significativa pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

A atratividade de alguns dos compostos identificados neste estudo, já foram reportados na literatura. López-Guillén *et al.* (2011), demonstraram que machos e fêmeas de *A. obliqua* foram atraídos para o composto (*Z*)-3-nonenol quando comparado com o tratamento controle (hexano). Além disso, os resultados demonstraram que a ausência dos compostos (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e (*Z*)-3-nonen-1-ol nas misturas C e D respectivamente, diminuíram o número médio de comportamentos exibidos pelas fêmeas de *A. obliqua* quando comparados a mistura A, sugerindo que tais componentes sejam essenciais para a exibição do comportamento do inseto. Em relação à ausência dos compostos α -farneseno, linalol e 1-heptanol nas misturas B, E e F respectivamente, observou-se um aumento da média comportamental em comparação com a mistura A, indicando que tais componentes apresentam impacto menor na média de comportamentos exibidos por

fêmeas. A diferença estatística observada para a mistura **A** em relação às misturas quaternárias, pode estar relacionada com a percepção olfativa dos insetos, sugerindo nesse caso que a complexidade dessa mistura pode ter contribuído para tal diferença apresentada quando a mesma foi comparada ao extrato de machos de *A. obliqua*. Esses resultados corroboram com aqueles descritos por Robacker *et al.* (1992), Zhu *et al.* (2003) e Alagarmalai *et al.* (2009) os quais demonstraram, para outras espécies de moscas das frutas, que misturas contendo um maior número de compostos foram mais atrativas do que aquelas com um número menor de substâncias.

Conclusões:

Este trabalho identificou os compostos 1-heptanol, linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno como EAD ativos para as fêmeas de *A. obliqua* e através das misturas preparadas, avaliou o efeito de redundância onde foi evidenciado que todas as misturas testadas foram atraentes o que sugere que estes componentes são essenciais na interação entre machos e fêmeas desta espécie; entretanto faz-se necessário a condução de ensaios em condições seminaturais para definir quantitativamente e qualitativamente o emprego destas misturas em testes de atratividade no campo.

Referências bibliográficas

- ALAGARMALAI, Jeyasankar *et al.* Identification of host attractants for the Ethiopian fruit fly, *Dacus ciliatus* Loew. *Journal of chemical ecology*, v. 35, n. 5, p. 542-551, 2009.
- BIASAZIN, Tibebe Dejene *et al.* Identification of host blends that attract the African invasive fruit fly, *Bactrocera invadens*. *Journal of chemical ecology*, v. 40, n. 9, p. 966-976, 2014.
- CRUZ-LÓPEZ, Leopoldo; MALO, Edí A.; ROJAS, Julio C. Sex pheromone of *Anastrepha striata*. *Journal of chemical ecology*, v. 41, n. 5, p. 458-464, 2015.
- <http://www.fao.org/faostat/en/>. Acessado em 10/01/2018.
- <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Acessado em 10/01/2018
- LINZ, Jeanine *et al.* Host plant-driven sensory specialization in *Drosophila erecta*. In: Proc. R. Soc. B. The Royal Society, 2013. p. 20130626.
- LÓPEZ-GUILLÉN, Guillermo *et al.* Olfactory responses of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) to volatiles emitted by calling males. *Florida Entomologist*, v. 94, n. 4, p. 874-881, 2011.
- MALAVASI, Aldo; ZUCCHI, Roberto Antonio; SUGAYAMA, R. L. Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Holos Editora, 2000.
- MILET-PINHEIRO, Paulo *et al.* Identification of male-borne attractants in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Chemoecology*, v. 25, n. 3, p. 115-122, 2015.
- NORRIBON, A.L. & Kim, K.C. A list of the reported host plant of the species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). U.S. Dept. Agric., APHIS (PPQ) 81-52. 114p. 1988.
- ROBACKER, D. C.; WARFIELD, W. C.; FLATH, R. A. A four-component attractant for the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae), from host fruit. *Journal of chemical ecology*, v. 18, n. 7, p. 1239-1254, 1992.
- TREICHEL, M. *et al.* Anuário Brasileiro de Fruticultura 2016. Editora Gazeta Santa Cruz: Santa Cruz do Sul, 2016.
- VILELA, Evaldo Ferreira; LÚCIA, Terezinha; DELLA, M. C. Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação. In: Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação. Holos editora, 2001.
- ZHU, Junwei; PARK, Kye-Chung; BAKER, Thomas C. Identification of odors from overripe mango that attract vinegar flies, *Drosophila melanogaster*. *Journal of chemical ecology*, v. 29, n. 4, p. 899-909, 2003