

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

IDENTIFICAÇÃO DE SEMIOQUÍMICOS E PERCEPÇÃO OLFATIVA DE
Alphitobius diaperinus Panzer (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) A
VOLÁTEIS DE COESPECÍFICOS

Marla Juliane Hassemer
Bióloga/UNOESC

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase Entomologia

Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro de 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Hassemer, Marla Juliane
Identificação de semioquímicos e percepção olfativa
de *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera:
Tenebrionidae) a voláteis de coespecíficos / Marla
Juliane Hassemer. -- 2014.
63 f.

Orientador: Josué Sant'Ana.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2014.

1. *Alphitobius diaperinus*. 2. Semioquímicos. 3.
Casudinho-dos-Aviários . I. Sant'Ana, Josué,
orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois “Tudo posso naquele que me fortalece.” Filipenses 4:13.

À minha família, em especial meus pais, Ladir e Nelsi, que sempre acreditaram na minha capacidade. Por toda compreensão e incentivo na busca por mais este objetivo.

Ao meu parceiro Luis Felipe por todo apoio, companheirismo, carinho e compreensão.

Ao meu orientador Dr. Josué Sant’ Ana pela oportunidade, dedicação, confiança e pela parceria nesses dois anos.

À minha coorientadora de coração, Dra. Maria Carolina Blassioli de Moraes, pelos preciosos ensinamentos, dedicação, paciência e solicitude.

À toda a equipe do Laboratório de Semioquímicos da Embrapa/Cenargen, pela acolhida durante o tempo em que estive em Brasília. Principalmente aos Drs. Miguel Borges e Raúl Laumann pelo incentivo e sugestões. Ao MSc. Márcio Wandré Moraes de Oliveira, pela paciência ao ensinar e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À Embrapa Suínos e Aves, principalmente ao MSc. Anildo Cunha Junior e Dr. Gerson Neudi Scheuermann por terem confiado a mim este projeto, por toda dedicação e incentivo.

À Monique Caumo, pelo trabalho e dedicação com “nossos filhos”.

À todos os colegas e professores do BIOECOLAB e LEEQI pela amizade e convivência. E aos bons amigos que conquistei ao longo desta jornada e aos que já me acompanham há muito tempo, pelo suporte nas horas difíceis e companheirismo nos momentos de alegria.

À CAPES pela bolsa oferecida.

À UFRGS pelo curso oferecido.

IDENTIFICAÇÃO DE SEMIOQUÍMICOS E PERCEPÇÃO OLFATIVA DE *Alphitobius diaperinus* PANZER (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) A VOLÁTEIS DE COESPECÍFICOS¹

Autor: Marla Juliane Hassemer
Orientador: Josué Sant'Ana

RESUMO

O cascudinho-dos-aviários, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera, Tenebrionidae), é uma importante praga na avicultura industrial. A presença deste inseto em aviários pode prejudicar sistemas de isolamento térmico de galpões climatizados e influenciar de forma negativa os índices de desempenho zootécnico das aves. Este fato se deve tanto à perda de ganho de peso relacionada à baixa conversão alimentar dos insetos pelas aves, como ao fato deste ser um potencial transmissor de doenças avícolas. O uso indiscriminado de inseticidas na cama do aviário e a falta de uma tecnologia adequada de aplicação tornam este controle inadequado. Desta forma, este trabalho teve como objetivos identificar o feromônio de agregação e as substâncias presentes nas glândulas abdominais de *A. diaperinus*, bem como, avaliar as respostas comportamentais e eletrofisiológicas desta espécie frente a estes voláteis, visando uma alternativa para o controle e/ou manejo comportamental desta praga. A extração dos voláteis presentes nas glândulas abdominais foi feita por dissecação (10 indivíduos/sexo). Já para obtenção dos compostos feromonais foram utilizadas câmaras de aeração (200 insetos/sexo). Os extratos foram analisados em cromatógrafo gasoso acoplado a detector de ionização de chamas e cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas. O comportamento de *A. diaperinus* frente ao extrato das glândulas foi observado em olfatômetro de múltipla escolha e ao feromônio, em um de dupla, tipo "Y". A bioatividade eletrofisiológica ao extrato das glândulas abdominais também foi avaliada. Foram identificados 26 compostos nas glândulas de *A. diaperinus*, destes, somente 1,4-benzoquinona, 2-metil-1,4-benzoquinona e 2-etil-1,4-benzoquinona foram bioativos nas antenas dos insetos. Machos e fêmeas foram repelidos tanto quando expostos aos extratos glandulares, quanto à mistura sintética das três substâncias bioativas. Foram identificados seis compostos feromonais macho-específicos: (*R*)-limoneno, (*E*)- β -ocimeno, 2-nonanona, (*S*)-linalol, (*R*)-dauceno e (*E,E*)- α -farneseno. Tanto o extrato de machos, quanto a mistura total das substâncias sintéticas foram atrativas a ambos os sexos do cascudinho-dos-aviários.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (63p.) Fevereiro, 2014.

SEMIOCHEMICALS IDENTIFICATION AND OLFACTORY PERCEPTION OF *Alphitobius diaperinus* Panzer (COLEOPTERA:TENEBRIONIDAE) TO CONSPECIFIC VOLATILES¹

Author: Marla Juliane Hassemer
Advisor: Josué Sant'Ana

ABSTRACT

The lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera:Tenebrionidae) is an important pest of poultry industry. The presence of this insect can damage the insulation systems in poultry houses and negatively influence the indices of growth performance. It is due to both the loss of gain weight related to low feed conversion of insects by birds, and also the fact that insects are a potential transmitters of poultry diseases. The indiscriminate use of insecticides on poultry litter and the lack of a suitable application technology make this an inappropriate control. Thus, the objectives of this study were to identify the aggregation pheromone and the substances present in abdominal glands of *A. diaperinus*, as well as evaluating the behavior and electrophysiological responses of this specie to these volatiles, targeting an alternative for the control and/or behavioral management of this pest. The extraction of volatiles present in the abdominal glands was made by dissection (10 individuals/sex). Regarding to pheromonal compounds aeration chambers (200 insects/sex) were used. The extracts were analyzed by gas chromatography coupled with a flame ionization detector and gas chromatography coupled to mass spectrometry. The behavior of *A. diaperinus* against extract of the glands was observed in multiple-choice olfactometer and against pheromone, in a dual, type "Y". The electrophysiological bioactivity against abdominal glands extracts was also evaluated. Twenty-six compounds were identified in the glands of *A. diaperinus*, which only 1,4-benzoquinone, 2-methyl-1,4-benzoquinone and 2-ethyl-1,4-benzoquinone were bioactive in the antennae of insects. Males and females were both repelled as when exposed to glandular extracts or as the synthetic mixture of the three bioactive substances. Six male-specific pheromonal compounds were identified: (*R*)-limonene, (*E*)- β -ocimene, 2-nonanone, (*S*)-linalool (*E,E*)- α -farnesene and daucene. The extract of males, as well as the total mixture of synthetic substances were attractive to both sexes of the lesser mealworm.

¹Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (63p.). February, 2014.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Avicultura industrial.....	3
2.2 <i>Alphitobius diaperinus</i>	4
2.2.1 Aspectos bioecológicos.....	4
2.2.2 Impacto econômico.....	5
2.3 Métodos de controle.....	6
2.4 Comunicação química.....	7
2.4.1 Tenebrionidae.....	7
2.4.2 Diferenças interpopulacionais na emissão de feromônios.....	9
2.5 Feromônios no manejo e controle de coleópteros.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Local.....	12
3.2 Obtenção e criação de <i>A. diaperinus</i>	12
3.3 Extração dos semioquímicos de <i>A. diaperinus</i>	13
3.3.1 Glândulas abdominais.....	13
3.3.2 Feromônio de agregação.....	15
3.4 Eletroantenografia.....	18
3.5 Olfatometria.....	19
3.5.1 Glândulas abdominais.....	19
3.5.1.1 Extratos.....	19
3.5.1.2 Mistura sintética.....	20
3.5.2 Feromônio de agregação.....	21
3.5.2.1 Extrato.....	21
3.5.2.1 Mistura sintética.....	21
3.6 Análises estatísticas.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Glândulas abdominais.....	24
4.1.1 Análises químicas.....	24
4.1.2 Eletroantenografia.....	27
4.1.3 Olfatometria: extratos de glândulas abdominais.....	27
4.1.4 Olfatometria: mistura sintética.....	28
4.2 Feromônio de agregação.....	32
4.2.1 Análises químicas.....	32
4.2.2 Olfatometria: extratos de machos.....	35
4.2.3 Olfatometria: mistura sintética.....	35

	Página
5 CONCLUSÕES.....	40
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
8 APÊNDICES.....	50

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Quantidade média (ng/ par de glândulas) \pm (EP) e índice de retenção dos compostos presentes nas glândulas abdominais de fêmeas e machos de <i>Alphitobius diaperinus</i>	26
2. Quantidade média (ng/inseto) \pm (EP) e índice de retenção dos compostos feromonais produzidos por machos de <i>Alphitobius diaperinus</i> (n = 3).	34

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Ciclo de vida de <i>Alphitobius diaperinus</i> . Todas as escalas correspondem a 3 mm (Adaptado de Lambkin, 2001).....	4
2. Porção ventral do abdome de pupas de <i>Alphitobius diaperinus</i> A) fêmea com projeções musculares esclerotinizadas (indicadas pelas flechas) e B) machos com pequenas papilas (indicadas pela flecha), sem projeções definidas. (Adaptado de Esquivel et al., 2012).....	13
3. Glândulas abdominais (flechas) localizadas entre o 7° e 8° urosternitos de <i>Alphitobius diaperinus</i>	14
4. Sistema de aeração. A) filtro de carvão ativo, B) borbulhador de água, C) câmaras de aeração e D) tubos de vidro com adsorventes....	16
5. Olfatômetro de múltipla escolha. A) bomba de ar, B) fluxímetros, C) borbulhador de água, D) entradas de ar, E) vácuo, F) braço do olfatômetro, G) área resposta.....	20
6. Olfatômetro de dupla escolha tipo Y. A) bomba de ar, B) fluxímetro, C) borbulhador de água, D) fontes de odor, E) local de liberação do inseto, F) área resposta.....	22
7. Cromatogramas do extrato de glândulas de fêmeas (A) e machos (B) de <i>Alphitobius diaperinus</i> . Os números indicam os principais compostos identificados por comparação com a biblioteca de espectros de massas e cálculo de índice de retenção. 1) 1,4-benzoquinona, 2) α -pineno, , 3) sabineno, 4) β -pineno, 5) 2-metil-1,4-benzoquinona, 6) (S)-limoneno, 7) 5-butil-ciclohexadieno, 8) 1-undeceno, 9) 2-etil-p-benzoquinona, 10) 4H-1,3 benzodioxin, 11) decanal, 12) hidroquinona, PI) padrão interno: 2,4-decadien-1-ol 13) 2-metil-1,4-benzenodiol, 14) sesquiterpeno desconhecido, 15) 2-etil-1,4-benzenodiol, 16) 3H-Ciclopentapiridazin-3-one 17) α -amorfenol, 18) acoradieno ,19) γ -muroleno , 20) β -himachaleno , 21) α -curcumeno, 22) α -chamigreno , 23) β -bisaboleno, 24) cupareno, 25) β -sesquifelandreno, 26) sesquiterpeno desconhecido.....	25

	Página
8. Cromatogramas (CG) do extrato das glândulas abdominais ventrais de fêmeas de <i>Alphitobius diaperinus</i> com detecção simultânea por DIC (inferior) e EAD (superior) utilizando uma antena de fêmea (A) e macho (B) (n = 6). Os picos 1, 2 e 3 foram identificados por comparação com padrões sintéticos como sendo, 1,4-benzoquinona, 2-metil-1,4-benzoquinona e 2-etil-1,4-benzoquinona.....	28
9. Percentagens do tempo de residência de fêmeas e de machos ao hexano e aos extratos (0,1 IE) das glândulas abdominais de fêmeas (A) e machos (B), respectivamente (n=40). EGA = Extrato da Glândula Abdominal. Tempo de observação: 5 min. * Teste de Friedman ($\alpha = 0,05$).....	30
10. Percentagens do tempo de residência de fêmeas e machos de <i>Alphitobius diaperinus</i> , em olfatômetro de múltipla escolha (n=40). MS = mistura sintética, composta por 1,4-benzoquinona, 2-metil-1,4-benzoquinona e 2-etil-1,4-benzoquinona (0,1 IE). Tempo de observação: 5 min. * Teste de Friedman ($\alpha = 0,05$).....	31
11. Cromatogramas do extrato de aeração do controle (sem insetos) (A), de 200 fêmeas (B) e 200 machos (C) de <i>Alphitobius diaperinus</i> por 24 horas. Os números indicam os compostos macho específicos identificados por comparação com padrões autênticos. 1) (R)-limoneno, 2) (E)- β -Ocimeno, 3) 2-nonanona, 4) (S)-linalol, 5) (R)-dauceno e 6) (E,E)- α -farneseno	33
12. Percentagens de respostas de de ambos os sexos de <i>Alphitobius diaperinus</i> ao extrato de aeração de machos e ao controle (hexano) em olfatômetro Y. Algarismos dentro das barras referem-se ao número de indivíduos que responderam aos tratamentos. *Diferença significativa através da análise do Qui-quadrado ($\alpha = 0,05$).....	35
13. Percentagens de respostas de ambos os sexos de <i>Alphitobius diaperinus</i> a mistura feromonal sintética (MT) [(R)-limoneno + (Z)- β -ocimeno + 2-nonanona + (S)-linalol + (R)-dauceno + (E,E)- α -farneseno] e ao controle (hexano) em olfatômetro Y. Algarismos dentro das barras referem-se ao número de indivíduos que responderam aos tratamentos. *Diferença significativa através da análise do Qui-quadrado ($\alpha = 0,05$).....	36

14. Percentagens de respostas de ambos os sexos de *Alphitobius diaperinus* a misturas feromonais sintéticas e ao controle (hexano) em olfatômetro Y. A) MT menos (Z)- β -ocimeno, B) MT menos (Z)- β -Ocimeno e (S)-Linalol, C) MT menos (Z)- β -Ocimeno e (R)-dauceno, D) MT menos (Z)- β -ocimeno e (R)-limoneno, E) MT menos (Z)- β -ocimeno e 2-nonanona, F) MT menos (Z)- β -ocimeno e (E,E)- α -farneseno. MT= Mistura sintética Total [(R)-limoneno + (Z)- β -ocimeno + 2-nonanona + (S)-linalol + (R)-dauceno + (E,E)- α -farneseno]. Algarismos dentro das barras referem-se ao número de indivíduos que responderam aos tratamentos. *diferença significativa através da análise do Qui-quadrado ($\alpha = 0,05$).....

1 INTRODUÇÃO

A avicultura industrial é um dos setores de maior expressão no agronegócio brasileiro. Mesmo com o alto desempenho, várias são as dificuldades encontradas durante a produção avícola, sendo a manutenção da adequada condição sanitária dos galpões de criação um dos fatores de maior preocupação. Com a intensificação da produção industrial de frangos, as instalações avícolas tornaram-se habitats ideais para o desenvolvimento de pragas, dentre estas, o “cascudinho-dos-aviários” *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae). Formas jovens e adultas podem afetar sistemas de isolamento térmico de galpões climatizados, bem como servir de alimento alternativo às aves, influenciando de forma negativa os índices de desempenho zootécnico das mesmas, como perda de peso devido à baixa conversão alimentar. Além disso, este tenebrionídeo é um importante hospedeiro e vetor de vírus, bactérias e fungos patogênicos e, portanto, um potencial transmissor de doenças.

Para o manejo desta praga são empregadas várias práticas de controle, com ênfase no controle químico. Porém, o uso indiscriminado de inseticidas na cama do aviário, bem como, a falta de tecnologia de aplicação, torna este controle inadequado, favorecendo o surgimento de populações resistentes. Do ponto de vista toxicológico, o uso excessivo de produtos químicos pode provocar deposição de seus resíduos nos tecidos das aves, fato que compromete a segurança dos alimentos, representando um risco iminente à saúde dos consumidores.

Em decorrência destes problemas, existe uma grande demanda para o desenvolvimento de produtos alternativos para o controle de *A. diaperinus*. Estudos relacionados as glândulas abdominais e ao feromônio de agregação deste inseto já foram realizados, nos Estados Unidos (Tseng, 1971; Bartelt *et al.*, 2009). Neste contexto, trabalhos de ecologia química de *A. diaperinus*, em suas regiões de ocorrência, podem auxiliar na elaboração de uma ferramenta de supressão populacional com base na utilização de feromônios para o manejo comportamental dessa praga em aviários.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivos: extrair e identificar semioquímicos de *A. diaperinus* de ocorrência no Brasil; avaliar as respostas comportamentais e eletroantenográficas de adultos do cascudinho-dos-aviários frente aos extratos das glândulas abdominais e aos compostos sintéticos e registrar as respostas comportamentais de adultos de *A. diaperinus* aos extratos do feromônio de agregação e compostos sintéticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Avicultura industrial

A avicultura industrial é um dos setores de maior relevância no agronegócio brasileiro, sendo responsável por aproximadamente 1,5% do PIB nacional. Em 2012, foram produzidos cerca de 13 milhões de toneladas de carne de frango, das quais 3,17 milhões foram exportadas. O Brasil é atualmente o terceiro maior produtor de frango de corte e sustenta a posição de maior exportador mundial desde 2004, sendo a região Sul, responsável por aproximadamente 73% dessas exportações. Do volume total produzido pelo país, 69% foram destinados ao consumo interno e 31% para exportações. Com isto, o consumo de carne de frango, no Brasil, atingiu 45 quilos por pessoa no ano de 2012 (UBABEF, 2013).

Mesmo com o alto desempenho da avicultura, várias são as dificuldades encontradas durante a produção, como, por exemplo, a manutenção da condição sanitária do aviário (Axtell & Arends, 1990). Dentre os problemas associados a essa atividade destaca-se o cascudinho-dos-aviários, *A. diaperinus*. A presença deste inseto está relacionada a queda na conversão alimentar das aves, pois essas ingerem o cascudinho em detrimento a ração balanceada. Os organismos desta espécie também são potenciais transmissores de patógenos causadores de doenças, como, Leucose Aviária, Coccidiose Intestinal, NewCastle e doença de Marek, as quais podem comprometer a viabilidade de lotes inteiros de aves (Axtell & Arends, 1990; Despins *et al.*, 1994; Despins & Axtell, 1995).

2.2 *Alphitobius diaperinus*

2.2.1 Aspectos bioecológicos

O cascudinho-dos-aviários, *A. diaperinus*, é um coleóptero originário do continente africano, com distribuição cosmopolita e pertencente à família Tenebrionidae (Dunford & Kaufman, 2006). Nesta família estão presentes cerca de 2900 espécies ocorrentes na região neotropical, destas, somente *A. diaperinus* é considerada praga em ambientes avícolas (Paiva, 2000).

O ciclo de vida do cascudinho (Figura 1) é de 55 (Chernaki & Almeida, 2001a) e 80 dias (Pinto, 2005), em temperaturas de 28 °C e 21 °C, respectivamente. Uma única fêmea pode depositar de 1000 a 1800 ovos férteis ao longo de sua vida (Dunford & Kaufman, 2006). Segundo Japp *et al.* (2010), a 27 °C e 80% UR, a eclosão ocorre, em média, cinco dias após a postura, a fase larval estende-se por 38 dias, possuindo até 11 instares de desenvolvimento, e a pupal dura cerca de cinco dias. Os adultos emergem ainda com o tegumento esbranquiçado, muito frágil e sem quitinização acentuada, porém em apenas quatro dias, estes já adquirem sua coloração característica de marrom a negra, podendo viver até um ano (Paiva, 2000).

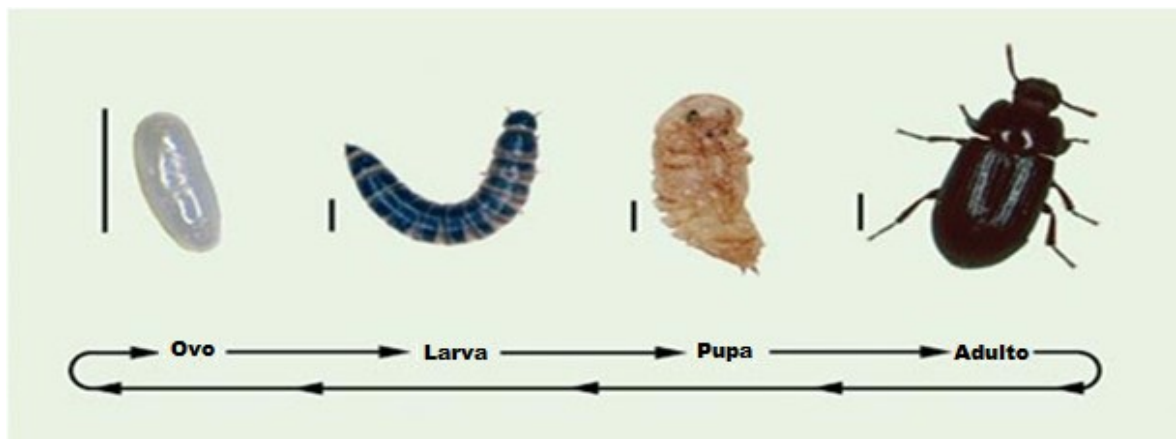


FIGURA 1. Ciclo de vida de *Alphitobius diaperinus*. Todas as escalas correspondem a 3 mm (Adaptado de Lambkin, 2001).

Nos insetos adultos ocorre dimorfismo sexual, os esporões das tíbias médias e posteriores nas fêmeas são retos e nos machos, um deles apresenta-se curvo e voltado para dentro. A porção final abdominal vista externamente não apresenta distinção entre os sexos, entretanto uma leve pressão nesta área induz a exteriorização dos órgãos genitais, o que possibilita a visualização do ovipositor nas fêmeas e do edeago nos machos (Chernaki & Almeida, 2001b; Esquivel *et al.*, 2012).

As pupas são do tipo exaratas de coloração amarela pálida, tornando-se posteriormente mais escuras em algumas partes do corpo. Na porção final do abdome destas é possível visualizar urogonfos larvais e acentuado dimorfismo sexual na região ventral, ou seja, nas fêmeas estão presentes projeções musculares bem esclerotinizadas e nos machos pequenas papilas, sem nenhuma projeção definida (Chernaki & Almeida, 2001b; Esquivel *et al.*, 2012).

Estes insetos possuem hábito onívoro, se alimentando tanto do material utilizado como cama no aviário, da ração, de excretas, de carcaças de frango, quanto de outras larvas e besouros (Axtell & Arends, 1990). Apresentam fototropismo negativo, abrigando-se durante o dia sob a superfície da cama ou junto a pilares e paredes do aviário. Já à noite, tornam-se mais ativos, sendo este o momento em que se deslocam dentro ou entre os aviários (Paiva, 2000).

2.2.2 Impacto Econômico

A presença de *A. diaperinus* afeta diretamente o desenvolvimento das aves, principalmente nos seus primeiros dias de vida, reduzindo o ganho de peso, e por consequência, a conversão alimentar das mesmas (Chernaki-Leffer *et al.*, 2001).

De acordo com Despins & Axtell (1995), pintos alimentados com larvas de *A. diaperinus* durante os primeiros seis dias de vida, tiveram uma diminuição de

84 g no peso em relação aos alimentados durante o mesmo período apenas com ração. Estes insetos também podem ser vetores ou portadores de patógenos, como bactérias, fungos e vírus. Isso se deve, principalmente, ao hábito alimentar necrófago e coprófago e por viverem em meio à cama em contato direto com as excretas (Chernaki-Leffer *et al.*, 2002; Vittori *et al.*, 2007).

Dentre as espécies de fungos toxicogênicos isolados do cascudinho-dos-aviários, foi observada a presença de *Aspergillus flavus*, sendo este o principal agente causador de aspergilose, responsável por altos índices de mortalidade em aves jovens e adultas (Nuez *et al.*, 2007). Esses insetos também são potenciais reservatórios de bactérias, como apontaram Chernaki-Leffer *et al.* (2002) e Vittori *et al.* (2007), os quais isolaram enterobactérias de *A. diaperinus*, como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*.

Estudos realizados por Hazeleger *et al.* (2008) confirmaram a persistência de bactérias dos gêneros *Salmonella* e *Campylobacter* no cascudinho, o que pode facilitar a transmissão destes agentes de um lote de aves para outro. Estas bactérias estão relacionadas a doenças de origem alimentar em humanos, que podem ser desencadeadas pela ingestão de carne de frango contaminada.

Além da relação direta com patógenos, as larvas deste inseto escavam túneis nas instalações avícolas, destruindo a proteção de poliuretano, usada no isolamento térmico dos galpões em regiões frias, reduzindo sua vida útil (Despins *et al.*, 1987).

2.3 Métodos de controle

O controle de *A. diaperinus* é difícil devido ao seu comportamento críptico, o que os leva a se abrigar em locais escuros e de difícil acesso como fendas, rachaduras, pilares, sob os comedouros e até mesmo abaixo do solo, onde geralmente empupam (Alves *et al.*, 2004). O manejo da cama entre lotes, feito

através do enleiramento e cobertura da cama com lona para fermentação, diminui o número de insetos, contudo, não evita as reinfestações da instalação após o alojamento de um novo lote de aves (Paiva, 2000).

Atualmente os controles utilizados contra o cascudinho baseiam-se em produtos químicos à base de piretroides (MAPA, 2014), porém o uso excessivo e inadequado tem selecionado populações resistentes (Japp *et al.*, 2010). Hassemer *et al.* (2012) estudaram a susceptibilidade de diferentes populações de *A. diaperinus* no oeste do estado de Santa Catarina frente a três princípios ativos do grupo dos piretroides (cipermetrina, deltametrina e λ -cialotrina). Segundo os autores, foi necessário o dobro da concentração recomendada pelos fabricantes dos produtos, para matar somente 50% da população. Chernaki-Leffer *et al.* (2011) também reportaram altos índices de resistência de *A. diaperinus* frente à cipermetrina em populações do inseto no estado do Paraná. Além dos problemas relacionados à resistência, Alves *et al.* (2004) e Santos *et al.* (2007) relataram que a utilização destes inseticidas pode causar a intoxicação das aves e efeito residual nos produtos cárneos.

2.4 Comunicação química

2.4.1 Tenebrionidae

As substâncias químicas envolvidas na comunicação entre os organismos são denominadas semioquímicos, definidos como qualquer substância liberada por um determinado organismo no ambiente, que provoca uma mudança fisiológica e/ou comportamental em outro. Tais substâncias podem ter ação intraespecífica (feromônio) ou interespecífica (aleloquímico) (Corrêa & Sant'Ana, 2007).

Geralmente os coleópteros sintetizam e armazenam as secreções de defesa e alarme em glândulas ou na própria hemolinfa. A liberação destas

substâncias está associada a reflexos do inseto em situações de perigo. Estes semioquímicos são multifuncionais, podendo ter ação repelente, tóxica, antimicrobiana ou surfactante (Dettner, 1987).

Compostos da classe das quinonas são comumente encontrados nas secreções defensivas de espécies de tenebrionídeos pertencentes aos gêneros *Alphitobius*, *Alphitophagus*, *Gnathocerus*, *Palorus*, *Tenebrio* e *Tribolium* (Tschinkel, 1975a). Em testes comportamentais realizados com *Tribolium confusum* du Val (Coleoptera:Tenebrionidae) frente a diferentes concentrações dos compostos etil-1,4-benzoquinona e metil-1,4-benzoquinona, componentes majoritários de sua secreção defensiva, foi constatado que em baixas quantidades (0,01 µg) estes atuam como feromônio de agregação (Verheggen *et al.*, 2007).

De acordo com Geiselhardt *et al.* (2009), as quinonas metil-1,4-benzoquinona e etil-1,4-benzoquinona estão presentes em nove espécies da subtribo Stizopina (Coleoptera: Tenebrionidae) e as mesmas desencadeiam respostas quimiotáxicas positivas entre espécies.

As glândulas abdominais de *A. diaperinus* tanto em machos quanto em fêmeas são bem desenvolvidas, não havendo diferenças morfológicas entre os sexos. Estas consistem basicamente de duas estruturas, as células secretoras e um largo e bifurcado reservatório para armazenamento da secreção (Tseng *et al.*, 1971). Os autores fizeram a identificação química desta secreção e chegaram a um total de seis compostos, sendo que destes, apenas dois foram identificados, ou seja, metil-1,4-benzoquinona e etil-1,4-benzoquinona, os demais, não tiveram suas estruturas elucidadas.

Além destas substâncias defensivas, os coleópteros também podem produzir feromônios de agregação e sexuais. Em Tenebrionidae, já foram

identificados os feromônios sexuais em machos de *Tenebrio molitor* Linnaeus (Z-3-acetato de dodecenila) (Bryning *et al.*, 2005) e de *Parastizopus transgaripepinus* Koch (1-trideceno) (Geiselhardt *et al.*, 2008). Já em espécies do gênero *Tribolium* foi extraído e identificado o composto 4,8-dimetildecanal, considerado feromônio de agregação para estes insetos (Arnaud *et al.*, 2002).

Em *A. diaperinus*, as substâncias (*R*)-limoneno, (*E*)- β -ocimeno, (*S*)-linalol, 2-nonanona e (*R*)-dauceno foram identificadas como feromônio de agregação de populações desta espécie ocorrentes nos Estados Unidos (Bartelt *et al.*, 2009).

2.4.2 Diferenças interpopulacionais na emissão de feromônios

A composição feromonal de uma espécie pode variar em relação a localização geográfica da mesma. Este fato foi constatado em diversos lepidópteros como *Ascotis selenaria* Schiffermüller (Geometridae) (Choi *et al.*, 2012), *Spodoptera frugiperda* Smith (Noctuidae) (Batista-Pereira *et al.*, 2006; Groot *et al.*, 2008), *Choristoneura rosaceana* Harris (Tortricidae) (El-Sayed *et al.*, 2003), *Hemileuca eglanterina* Boisduval (Saturniidae) (McElfresh & Millar, 2001) e *Ostrinia furnacalis* Guenée (Pyralidae) (Huang *et al.*, 1998). O mesmo foi registrado para coleópteros tais como *Ips pini* Say (Scolytidae) (Lanier *et al.*, 1980), *Ips subelongatus* Motsch (Scolytidae) (Song *et al.*, 2011) e *Rhabdoscelus obscurus* Boisduval (Curculionidae) (Giblin-Davis *et al.*, 2000). Os autores ressaltam que essas diferenças podem influenciar de forma negativa na utilização de armadilhas iscadas com o feromônio no manejo e controle de pragas, uma vez que tais diferenças provocam mudanças no comportamento da espécie.

Em *S. frugiperda*, Groot *et al.* (2008) relataram que as diferenças interpopulacionais quali e quantitativas no feromônio sexual dessa espécie se devem às plantas hospedeiras (milho e arroz), de onde os insetos retiram os compostos precursores para síntese do feromônio. Já no lepidóptero *Ostrinia*

nubialis Hübner (Pyralidae), as mudanças interpopulacionais no feromônio sexual se dão por diferenças genéticas, onde os precursores sofrem redução de forma diferenciada pela ação de enzimas. Os autores sugerem que estas mudanças genéticas poderiam indicar um processo de especiação por isolamento reprodutivo (Lassance *et al.*, 2010).

No coleóptero *I. pini*, populações provenientes de Nova York (EUA) produzem o (*R*)-Ipsdienol e o (*S*)-Ipsdienol (65:35) como feromônio de agregação, enquanto populações de Idaho (EUA) produzem somente o (*S*)-Ipsdienol e nestas populações ocorre inibição das respostas comportamentais de ambos os sexos na presença do isômero (*R*) (Lanier *et al.*, 1980). De acordo com os autores, se a formulação comercial do feromônio dessa espécie for baseada nas populações de Nova York, este produto não terá efeito sobre as populações de Idaho, uma vez que o isômero (*R*) encontra-se na mistura. Miller *et al.*, (1989) atribuíram estas diferenças interpopulacionais em *I. pini* principalmente aos níveis do composto mirceno, que é o precursor do ipsdienol, presentes no tecido da planta hospedeira.

2.5 Feromônios no manejo e controle de coleópteros

A utilização de feromônios tornou-se uma ferramenta útil no manejo integrado de pragas devido a sua eficiência, agregando especificidade no controle da praga alvo, com baixa ou nenhuma toxicidade (Witzgall *et al.*, 2010).

Armadilhas iscadas com feromônio já são utilizadas no Brasil para o monitoramento de pragas como o bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* Boherman. (Coleoptera: Curculionidae) (Fernandes *et al.*, 2001; Lima Jr. *et al.*, 2013), broca-da-cana *Migdolus fryanus* Westwood (Coleoptera: Cerambycidae) (Bento *et al.* 1992), broca-das-palmáceas *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus (Coleoptera: Curculionidae) (Navarro *et al.*, 2002; Cysne *et al.*, 2013), besouro-

castanho *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) e besouro–do-fumo *Lasioderma serricorne* Fabricius (Coleoptera: Anobiidae) (Arbogast *et al.*, 2000).

Já o método de coleta massal, que visa retirar do campo o maior número de insetos possível, é empregado no controle de pragas como, *Cosmopolites sordidus* Germar e *Metamasius hemipterus* Linnaeus (Coleoptera: Curculionidae) na Costa Rica, importantes na cultura da banana (Alpizar *et al.*, 2012), além de *Prionus californicus* Motschulsky (Coleoptera: Cerambycidae), praga na cultura do lúpulo (Maki, 2011) e *Agriotes* spp. (Coleoptera: Elateridae), gênero de importância econômica na cultura do milho (Milonas *et al.*, 2010), ambos nos EUA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Os trabalhos referentes à extração e identificação de voláteis de *A. diaperinus* foram realizados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CENARGEN/Brasília, Laboratório de Semioquímicos. As demais etapas foram executadas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Laboratório de Etologia e Ecologia Química de Insetos (LEEQI).

3.2 Obtenção e criação de *A. diaperinus*

Os insetos foram coletados em aviários experimentais do Laboratório de Ensino Zootécnico (LEZO) e transferidos para o LEEQI. Em laboratório, os adultos e as larvas foram separados da cama de aviário e transferidos para recipientes plásticos (20 x 10 x 10 cm) contendo uma camada de 7 cm de maravalha e 10 g de ração para frangos em terminação como alimento, mantidos na escotofase em câmara climatizada ($30 \pm 1^\circ\text{C}$; $60 \pm 10\%$ UR).

Os insetos foram sexados na fase de pupa com auxílio de lupa, com base nas diferenças na porção final do abdome (Figura 2), conforme descrito por Esquivel *et al.* (2012). Após, estas foram acondicionadas separadamente em recipientes plásticos (6 cm altura x 6 cm de diâmetro) contendo ração. A emergência foi acompanhada diariamente e os adultos foram agrupados por sexo e idade em recipientes plásticos com ração e serragem até o momento dos bioensaios.

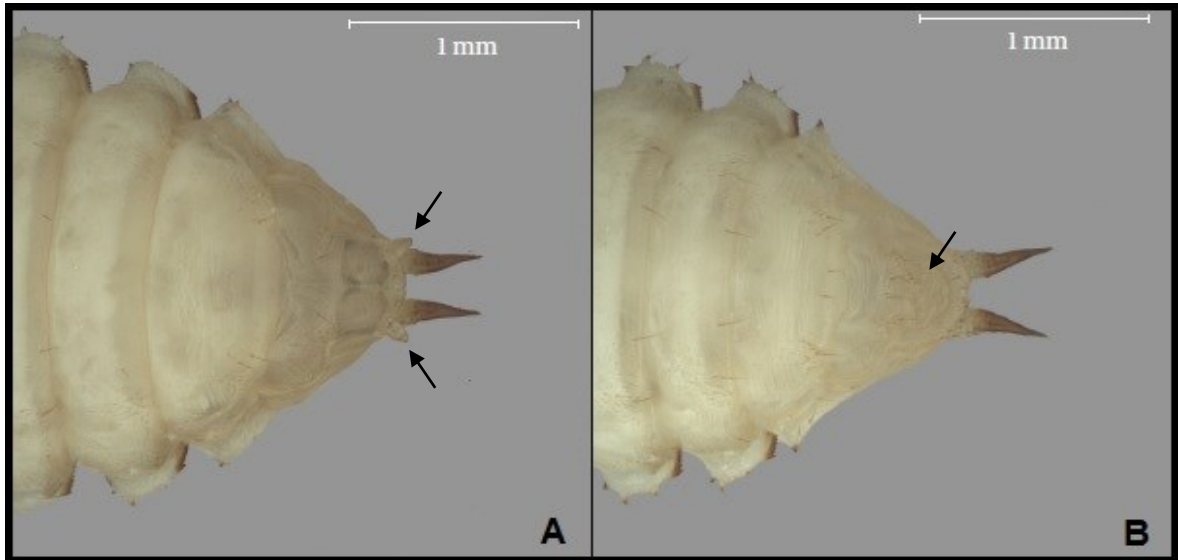


FIGURA 2. Porção ventral do abdome de pupas de *Alphitobius diaperinus* A) fêmea com projeções musculares esclerotinizadas (indicadas pelas flechas) e B) machos com pequenas papilas (indicadas pela flecha), sem projeções definidas. (Adaptado de Esquivel *et al.*, 2012).

3.3 Extração dos semioquímicos de *A. diaperinus*

3.3.1 Glândulas abdominais

Fêmeas e machos, maduros sexualmente, foram individualmente dissecados para retirada do par de glândulas abdominais localizadas entre o sétimo e oitavo urosternito (Figura 3). Sob lupa, com auxílio de uma tesoura microcirúrgica retirou-se as asas posteriores e os élitros dos insetos, em seguida foram feitas duas incisões laterais a partir da região lateral posterior do abdome até a altura do tórax. Os insetos foram, então, alfinetados no protórax e fixados em placa de Petri com fundo de parafina. Com auxílio de pinças de ponta fina foi retirada a cutícula dorso abdominal, puxando-a da parte anterior para a parte posterior do corpo. Uma vez localizadas, as glândulas foram retiradas com pinças ultrafinas (espessura da ponta 0,01 x 0,005 mm) (10 indivíduos/sexo) e imersas em *vial* de 2 mL contendo 500 μ L de hexano. Após 30 minutos de extração, a suspensão foi filtrada em pipeta Pasteur contendo lã de vidro e os extratos foram

previamente concentrados para 50 μL sob fluxo de N_2 para as análises cromatográficas e 100 μL para os bioensaios. Foram feitas sete extratos para cada sexo.

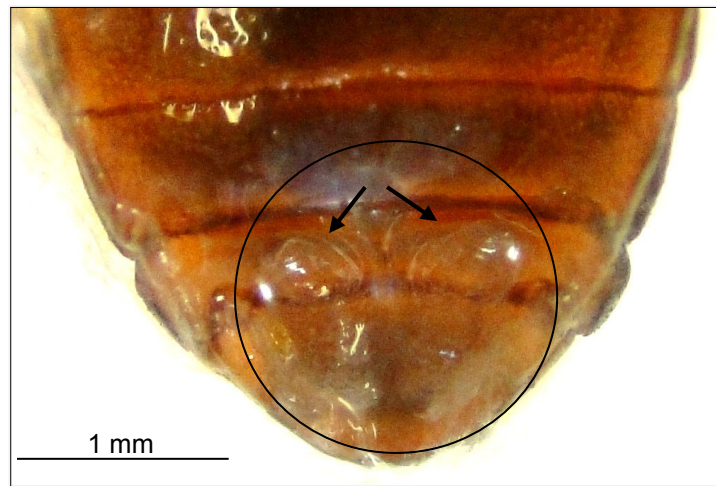


FIGURA 3. Glândulas abdominais (flechas) localizadas entre o 7° e 8° urosternitos de *Alphitobius diaperinus*.

Para as análises quantitativas deste extrato, 1 μL de uma solução 0,92mg/mL de 2,4-decanien-1-ol foi adicionado aos extratos como padrão interno. Para a análise por cromatografia gasosa com ionização por chama (CG-DIC Shimadzu 17A) 1 μL de cada extrato foi injetado manualmente usando o injetor no modo *splitless*. O CG-DIC estava equipado com uma coluna apolar DB-5MS (comprimento 30 m x diâmetro interno 0,25 mm x espessura do filme 0,25 μm , Agilent Technologies) e hélio foi usado como gás de arraste. A temperatura inicial da rampa foi de 50 °C por 2 minutos com um aumento gradual de 5 °C/min até 180 °C, seguido de um segundo aumento gradual de 10 °C/min até 250 °C por 20 min. A temperatura do detector foi de 270 °C e a do injetor de 250°C. A quantificação dos compostos produzidos por *A. diaperinus* nas glândulas foi conduzida através da comparação das áreas de cada composto em relação à área do padrão interno utilizado. Os dados foram coletados através do software

Class-CG. O fator de resposta do detector DIC foi considerado 1 para todos os compostos.

Para a identificação qualitativa dos compostos, extratos selecionados foram analisados por cromatografia gasosa (Agilent 5975 MSD) acoplado a um detector seletivo de massas (CG-EM) com ionização por impacto de elétrons (energia de ionização de 70 eV) e analisador quadrupolar. Os extratos também foram injetados manualmente em modo *splitless* e hélio foi usado como gás de arraste. O programa de temperatura e a coluna foram idênticos aos utilizados no CG-DIC. O padrão de fragmentação dos compostos foi comparado aos dados da biblioteca de espectro de massas (NIST-Wiley-database, 2008). As identificações foram confirmadas por comparação dos tempos de retenção, espectros de massas e cálculo dos índices de retenção. Para cálculo deste índice (Apêndice 1), uma mistura de padrões de alcanos (C9 a C24) foi utilizada, 1 µL da solução foi injetado no CG-EM nas mesmas condições cromatográficas descritas anteriormente.

3.3.2 Feromônio de agregação

Para extração e identificação do feromônio de *A. diaperinus*, 200 insetos (machos e fêmeas separadamente) com idade desconhecida foram acondicionados em tubos de vidro (40 cm comprimento x 7 cm de diâmetro) contendo aproximadamente 5 g de vermiculita umedecida com água destilada e uma peça de tela de aço (2 cm largura x 5 cm de comprimento x 2 mm malha). No tratamento controle foi feita a extração somente da vermiculita úmida e da tela de aço, para a verificação do sinal de fundo (Figura 4).

No sistema de aeração, o ar purificado em filtros de carvão ativo era impulsionado para um borbulhador contendo água destilada e direcionado para dentro das câmaras através de compressor de ar com vazão de 0,3 L/min por

câmara. Na saída, os voláteis eram adsorvidos em cartucho de vidro contendo, cada, 100 mg do polímero Porapak Q (Sigma-Aldrich®).

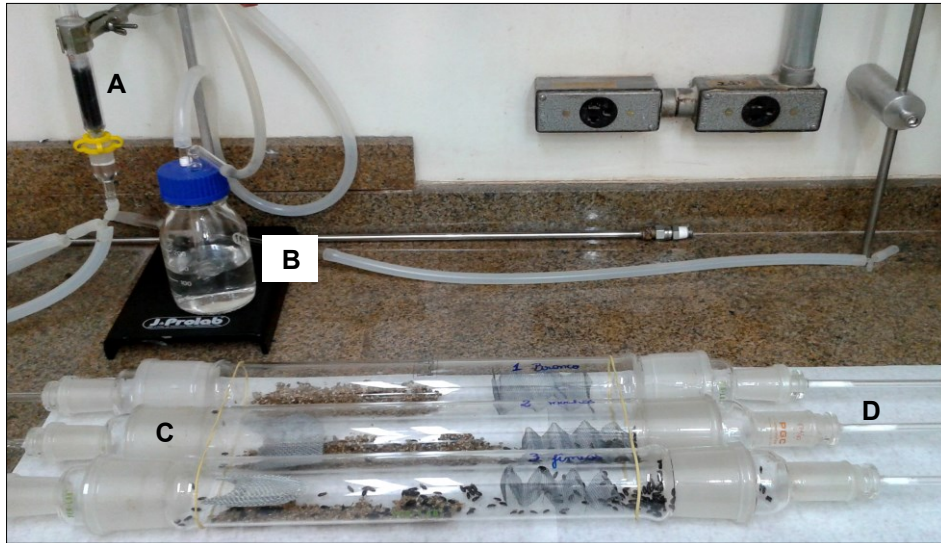


FIGURA 4. Sistema de aeração. A) filtro de carvão ativo, B) borbulhador de água, C) câmaras de aeração e D) tubos de vidro com adsorventes.

Todos os adsorventes orgânicos foram pré-condicionados por dessorção química através da adição de hexano destilado (10 mL) e térmica a 195°C sob fluxo de N₂ por 24 h.

Os insetos foram aerados na escotofase durante um dia e, em seguida, retirados das câmaras para alimentação por 48 h, sendo adicionado a estas, um novo grupo de insetos. Este procedimento foi realizado consecutivamente por 60 dias. Os insetos mortos foram substituídos.

A eluição dos cartuchos foi realizada com 500 µL de hexano destilado em *vials* com capacidade para 2 mL. Após esse procedimento, a amostra coletada foi pré-concentrada a 50 µL, sob fluxo de N₂, e os extratos mantidos sob refrigeração a -20 °C. Após as eluições, os cartuchos com adsorventes foram pré-condicionados por duas horas conforme descrito anteriormente.

As análises qualitativas e quantitativas dos extratos obtidos das aerações foram realizadas por CG-EM. Os extratos foram injetados manualmente em modo *splitless* e hélio foi usado como gás de arraste. O programa de temperatura e a coluna foram idênticos aos utilizados no item 3.3.1. Para a identificação das moléculas feromonais o padrão de fragmentação dos compostos foi comparado aos dados da biblioteca de espectro de massas (NIST-Wiley Database, 2008) e as identificações foram confirmadas por comparação dos tempos de retenção e espectros de massas com padrões autênticos. A confirmação dos compostos também foi realizada através de injeção de amostras selecionadas e dos padrões autênticos em CG-DIC (Shimadzu 17A, coluna polar HP – Innowax, comprimento 30 m x diâmetro interno 0,25 mm x espessura do filme 0,25 μm , Agilent Technologies).

Para elucidação da configuração absoluta do limoneno (Apêndice 2) e do linalol (Apêndice 3) presentes nos extratos, amostras selecionadas juntamente com padrões autênticos do limoneno (*R* e *S*) (TCI America[®]), (*R*)-linalol e (*R,S*)-linalol (Sigma-Aldrich[®]) foram injetados em CG-DIC usando uma coluna quiral (Agilent, Beta Dex[™] 325 comprimento 30 m x diâmetro interno 0,25 mm x espessura do filme 0,25 μm , Supelco[®]).

Alguns compostos coeluíram com contaminantes não identificados, não sendo possível uma separação apropriada para a quantificação. Assim, para os compostos 2-nonanona, (*E,E*)- α -farneseno, (*E*)- β -ocimeno, dauceno, (*R*)-limoneno e (*S*)-linalool, esta foi feita através do método de monitoramento de um único íon (*Single Ion Monitoring*, “SIM”). Para a 2-nonanona, os íons selecionados foram *m/z* 58, 127 e 142, e para os demais, todos de origem terpênic, os íons *m/z* 68, 93, 119, 121, 136, 161 e 204. Os íons selecionados não faziam parte do padrão de fragmentação dos contaminantes.

Para construção e padronização da curva de calibração, preparou-se soluções a partir de padrões autênticos dos compostos citados acima nas concentrações de 0,00125 mg/mL, 0,0025 mg/mL, 0,005 mg/mL, 0,007 mg/mL e 0,01 mg/mL. Cada solução e amostra foi injetada cinco vezes em CG-EM no método SIM, com programa de temperatura e coluna idênticos aos utilizados no CG-DIC.

3.4 Eletroantenografia

Adultos de *A. diaperinus* com idade desconhecida, foram sexados e individualizados em placas de Petri. Foi feita secção, sob estereomicroscópio binocular (Aumento 40x), de ambas antenas de cada inseto na altura do pedicelo, com auxílio de uma tesoura microcirúrgica, sendo a antena posicionada em eletrodo bifurcado de prata. A extremidade basal da antena aderida ao eletrodo neutro e a apical, ao registrador, ambas imersas em gel (Signa gel, Parker®) possibilitando a condutividade elétrica da amostra.

Uma alíquota de 2 µL dos extratos obtidos no item 3.3.1 foi injetada em CG-DIC (Perkin Elmer Autosystem XL, coluna HP5 comprimento 30 m x diâmetro interno 0,25 mm x espessura do filme 0,25 µm, Agilent Technologies) acoplado a um detector eletroantenográfico (Syntech IDAC – 2®). O eletrodo com a antena foi conectado a um pré amplificador e um fluxo de ar umidificado foi mantido continuamente sobre a antena para evitar a desidratação. Ao ser injetada, a amostra percorre toda extensão da coluna cromatográfica para que haja separação dos compostos. Ao final da corrida, o fluxo que está saindo da coluna é dividido em dois, parte vai para o DIC, conseqüentemente traçando o cromatograma, e a outra parte vai para o EAD, onde a resposta da antena é amplificada. Em função de ambas serem simultâneas, é possível saber se o

composto registrado pelo DIC é ou não bioativo na antena do inseto. Foram realizadas seis repetições por sexo.

3.5 Olfatometria

Nestes experimentos foram avaliadas as respostas comportamentais de fêmeas e machos virgens, de 10 a 15 dias de idade, a extrato das glândulas abdominais e ao feromônio de agregação de *A. diaperinus*. Os testes foram conduzidos em sala climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ UR) na escotofase, com auxílio de uma luz vermelha (70W, luminância igual a 135 lx). Antes do início dos experimentos, os insetos foram aclimatados por 30 min na sala de testes. Para a análise estatística, somente os insetos responsivos foram considerados. Foram realizadas de 30 a 40 repetições para cada tratamento e cada inseto foi observado por 5 minutos.

3.5.1 Glândulas abdominais

3.5.1.1 Extratos

O comportamento quimiotáxico de *A. diaperinus* foi observado em olfatômetro de múltipla escolha (22 cm de comprimento e largura, 1,5 cm de espessura interna) (Figura 5). O fluxo de ar, previamente filtrado com carvão ativo e umidificado através de um borbulhador contendo água destilada, foi conduzido para dentro do sistema com auxílio de um propulsor conectado em um fluxímetro a uma taxa de 0,3 L/min para cada braço do olfatômetro, sendo a taxa de vácuo total do sistema de 0,4 L/min. Após aclimação, os insetos foram liberados individualmente no centro do olfatômetro e submetidos à escolha entre quatro tratamentos, posicionados na extremidade de cada braço do olfatômetro. Foram utilizados 10 μL dos extratos obtidos no item 3.3.1. Estes foram pipetados em papel filtro (1,5 X 2 cm) e posicionados em três das extremidades (braços) do

olfatômetro, sendo colocado na quarta, o mesmo volume de solvente (hexano). A concentração dos extratos foi de 0,1 inseto equivalente/ μL (0,1 IE).

A cada cinco repetições o odor foi renovado e a cada dez o olfatômetro foi lavado com sabão neutro, água destilada, e seco em estufa de esterilização a 60°C . Após este procedimento, os tratamentos foram trocados de posição.

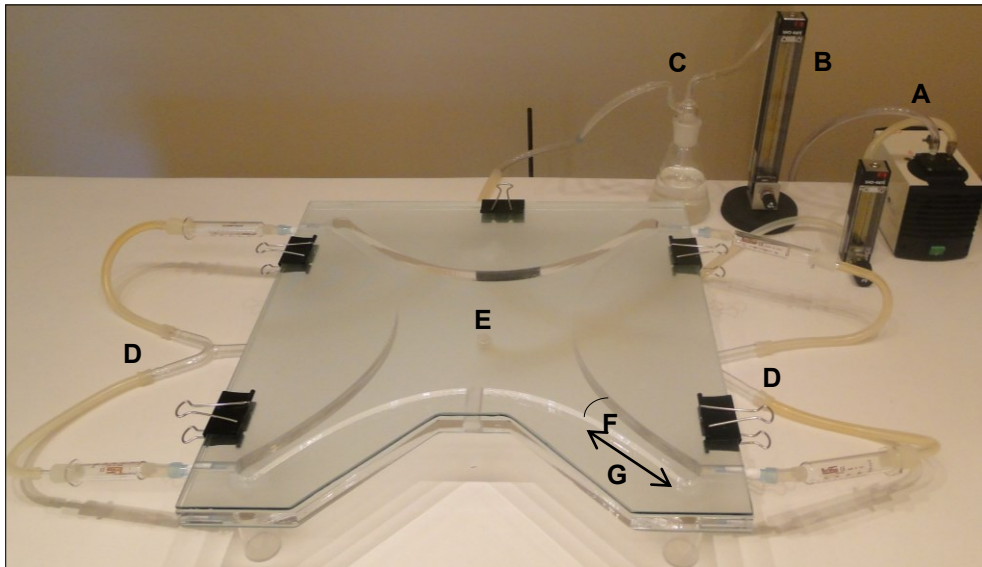


FIGURA 5. Olfatômetro de múltipla escolha. A) bomba de ar; B) fluxímetros; C) borbulhador de água, D) entradas de ar, E) vácuo, F: braço do olfatômetro, G) área resposta.

3.5.1.2 Mistura sintética

O protocolo experimental foi semelhante ao descrito no item 3.5.1.1. Foram avaliadas as respostas de *A. diaperinus* a três compostos sintéticos: 1,4-benzoquinona (PBQ), 2-metil-1,4-benzoquinona (MBQ) e 2-etil-1,4-benzoquinona (EBQ). A solução testada foi na mesma concentração dos extratos (0,1 IE).

Os padrões analíticos dos compostos 1,4-benzoquinona, 2-metil-1,4-benzoquinona foram obtidos comercialmente (Sigma Aldrich®), enquanto que o composto 2-etil-1,4-benzoquinona foi sintetizado a partir da 1,4-benzoquinona no laboratório de semioquímicos da Embrapa/Cenargen (Apêndice 4).

Em três braços do olfatômetro foram liberados odores dos compostos sintéticos do feromônio de alarme de *A. diaperinus* (PBQ = 4 µg/mL, MBQ = 95 µg/mL e EBQ = 295 µg/mL) e no quarto, o controle (hexano).

Para análise considerou-se o tempo de residência, em segundos, dos insetos em cada braço do olfatômetro. Os insetos que permaneceram somente na área central deste ou permaneceram por menos de 60s nos braços foram considerados não responsivos e, portanto, desconsiderados na análise estatística.

3.5.2 Feromônio de agregação

3.5.2.1 Extrato

O comportamento quimiotático de *A. diaperinus* foi observado em olfatômetro dupla escolha tipo “Y” de vidro (Figura 6), com diâmetro de 2 cm, arena inicial de 15 cm, bifurcada em dois “braços” de 10 cm cada. O protocolo experimental foi semelhante ao descrito no item 3.5.1. Foram utilizados 10 µL dos extratos descritos no item 3.3.2. Os quais foram pipetados em papel filtro de dimensões 1,5 X 2 cm e posicionado em uma das extremidades do olfatômetro, sendo colocado na outra o mesmo volume de solvente(hexano). A concentração do extrato foi de 1 inseto equivalente/µL (1 IE).

3.5.2.2 Mistura sintética

O protocolo experimental foi semelhante ao descrito no item 3.5.2.1. Os compostos sintéticos testados em todas as soluções estavam na concentração 1 IE. Foi avaliada a quimiotaxia de machos e fêmeas aos seguintes tratamentos: MT (Mistura Total) composta por (*E,E*)- α -farneseno (9 µg/mL) + (*Z*)- β -ocimeno (6 µg/mL) + 2-nonanona (1,4 µg/mL) + (*R*)-dauceno (3 µg/mL) + (*R*)-limoneno (9 µg/mL) + (*R,S*)-linalol (10 µg/mL); mistura A [MT menos (*Z*)- β -ocimeno (6 µg/mL)]; B [MT menos *Z*- β -ocimeno (6 µg/mL) e *R,S*-linalol (10 µg/mL)]; C [MT menos (*Z*)- β -ocimeno (6 µg/mL) e (*R*)-dauceno (3 µg/mL)]; D [MT menos (*Z*)- β -ocimeno (6

$\mu\text{g/mL}$) e (*R*)-limoneno ($9 \mu\text{g/mL}$); E [MT menos (*Z*)- β -ocimeno ($6 \mu\text{g/mL}$) e 2-nonanona ($1,4 \mu\text{g/mL}$)] e F [MT menos (*Z*)- β -ocimeno ($6 \mu\text{g/mL}$) e (*E,E*)- α -farneseno ($9 \mu\text{g/mL}$)].

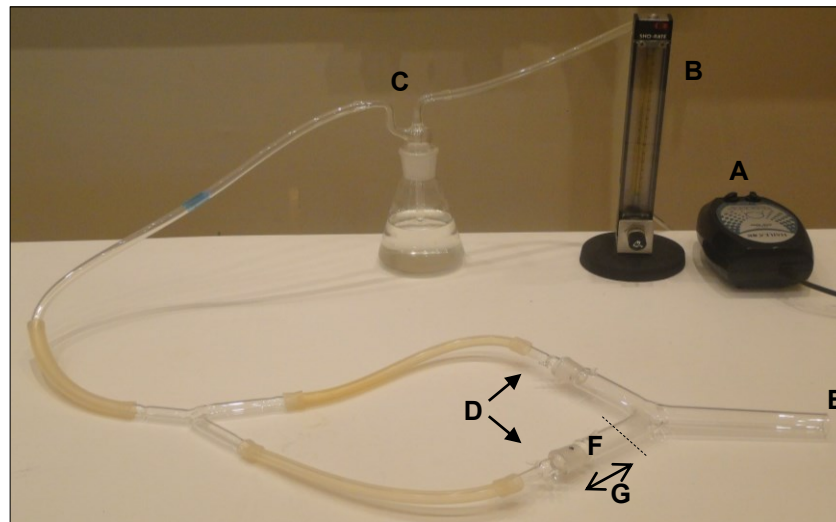


FIGURA 6. Olfátometro de dupla escolha tipo Y. A) bomba de ar, B) fluxímetro, C) borbulhador de água, D) fontes de odor; E) local de liberação do inseto, F) área resposta.

Os padrões analíticos foram obtidos comercialmente (Sigma Aldrich®), com exceção do (*R*)-dauceno que foi sintetizado a partir do carotol, extraído de sementes de cenoura (Apêndice 5), no laboratório de semioquímicos da Embrapa/Cenargen. Os bioensaios foram feitos com o isômero (*Z*) do β -ocimeno, pois não foi possível obter o isômero (*E*). No caso do composto linalol, o padrão analítico utilizado foi uma mistura de isômeros (*R,S*)-linalol (3:1). Como não foi possível chegar a configuração absoluta do dauceno, o isômero utilizado foi o (*R*).

Para análise considerou-se o tempo de residência dos insetos em cada braço do olfátometro. Os insetos que permaneceram somente no braço principal ou permaneceram por menos de 60s nos braços, foram considerados não responsivos e, portanto, desconsiderados na análise estatística.

3.6 Análises estatísticas

Para a análise das concentrações dos compostos identificados nas glândulas abdominais, foram calculadas médias e erro padrão, sendo os resultados comparados pelo teste *t*, através do Software Bioestat 4.0[®] (Ayres *et al.*, 2006).

Nos experimentos comportamentais de dupla escolha, os dados foram comparados pela análise do Qui-quadrado, e nos bioensaios de múltipla escolha foram comparados pelo teste de Friedman, através do software Bioestat 4.0[®] (Ayres *et al.*, 2006). O nível de confiabilidade foi de 95%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Glândulas abdominais

4.1.1 Análises químicas

Foram identificados 26 compostos presentes tanto nas glândulas abdominais de fêmeas, quanto nas de machos de *A. diaperinus* (Figura 7), não havendo diferenças qualitativas destas substâncias entre os sexos.

Os compostos majoritários foram as quinonas, 2-etil-1,4-benzoquinona e 2-metil-1,4-benzoquinona, respectivamente, sendo os demais do grupo dos hidrocarbonetos (monoterpenos e sesquiterpenos), cetonas, álcoois e aldeídos (Tabela 1). Foram constatadas diferenças quantitativas significativas, em relação aos perfis cromatográficos entre os dois sexos, somente para γ -muroлено ($P = 0,02$) e cupareno ($P = 0,03$). Ambos foram registrados em maior quantidade no extrato de fêmeas. Apesar disso, não houve diferença significativa na quantidade média (ng) total ($P = 0,432$) de compostos encontrados nas glândulas de machos e fêmeas de *A. diaperinus*.

Tseng *et al.* (1971) descreveram um total de seis compostos nas glândulas abdominais de machos e fêmeas de *A. diaperinus*. Destes, somente os majoritários 2-metil-1,4-benzoquinona e 2-etil-1,4-benzoquinona tiveram suas estruturas elucidadas, os demais não foram identificados. Os autores também avaliaram a morfologia destas glândulas e relataram que não há diferenças morfológicas entre os sexos. Os resultados destes autores corroboram os obtidos no presente estudo. No entanto, o número de compostos identificados neste

trabalho foi maior (26) e não constatou-se diferenças qualitativas entre as substâncias presentes nos extratos de machos e fêmeas.

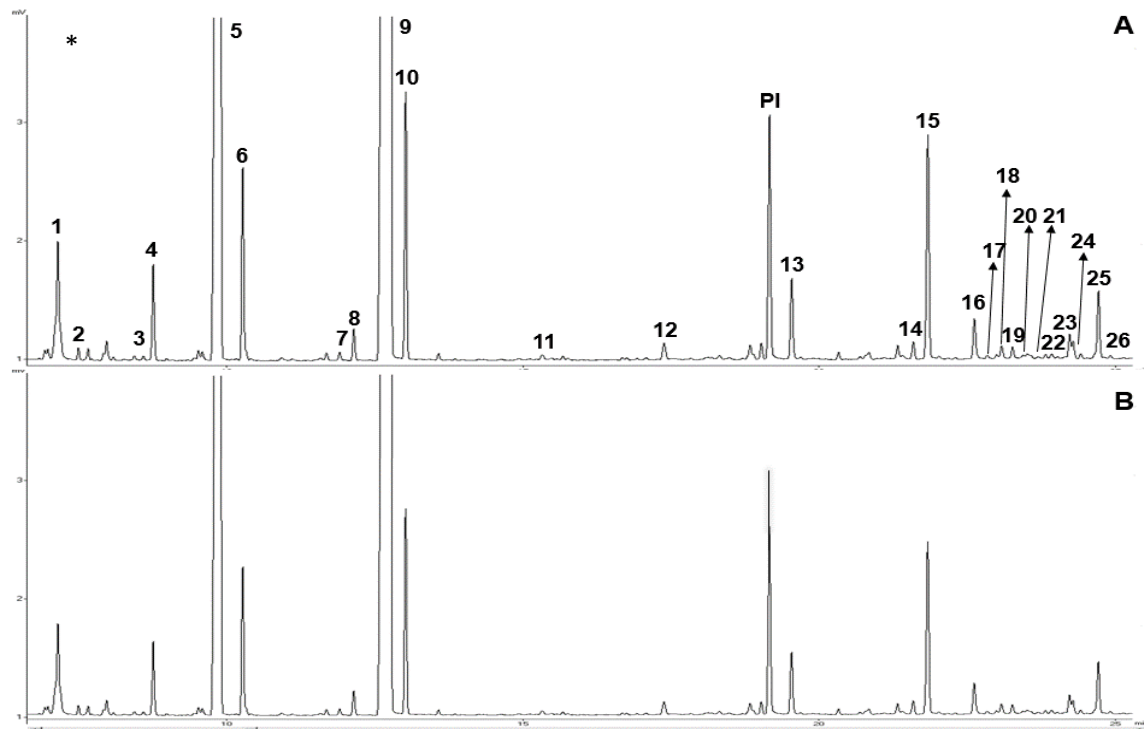


FIGURA 7. Cromatogramas do extrato de glândulas de fêmeas (A) e machos (B) de *Alphitobius diaperinus*. Os números indicam os principais compostos identificados por comparação com a biblioteca de espectros de massas e cálculo de índice de retenção. 1) 1,4-benzoquinona, 2) α -pineno, 3) sabineno, 4) β -pineno, 5) 2-metil-1,4-benzoquinona, 6) (S)-limoneno, 7) 5-butil-ciclohexadieno, 8) 1-undeceno, 9) 2-etil-p-benzoquinona, 10) 4H-1,3 benzodioxin, 11) decanal, 12) hidroquinona, PI) padrão interno: 2,4-decadien-1-ol 13) 2-metil-1,4-benzenodiol, 14) sesquiterpeno desconhecido, 15) 2-etil-1,4-benzenodiol, 16) 3H-Ciclopentapiridazin-3-one 17) α -amorfenno, 18) acoradieno, 19) γ -muroleno, 20) β -himachaleno, 21) α -curcumeno, 22) α -chamigreno, 23) β -bisaboleno, 24) cupareno, 25) β -sesquifelandreno, 26) sesquiterpeno desconhecido.

A composição química das glândulas abdominais de *A. diaperinus* corresponde ao que já vem sendo encontrado em outros tenebrionídeos, como *Eleodes longicollis*, *Tribolium castaneum* (Happ, 1968), *Blaps mucronata* Latreille (Tannert & Hien, 1973), *T. molitor* (Attygalle *et al.*, 1991) e *Ulomoides dermestoides* (Mendoza & Saavedra, 2013) composta basicamente por benzoquinonas em maior concentração, seguida de hidrocarbonetos,

principalmente sesquiterpenos, além de quantidades menores de álcoois, aldeídos e cetonas.

TABELA 1. Quantidade média (ng/ par de glândulas) \pm (EP) e índice de retenção dos compostos presentes nas glândulas abdominais de fêmeas e machos de *Alphitobius diaperinus*.

Compostos	Fêmeas	Machos	Índice de retenção
1,4-benzoquinona***	*41,64 \pm 9,70a	*47,36 \pm 17,10a	924
α-pineno**	5,32 \pm 0,90a	4,66 \pm 1,40a	937
sabineno**	0,92 \pm 0,20a	0,53 \pm 0,20a	976
β-pineno**	17,32 \pm 3,40a	11,61 \pm 3,70a	981
2-metil-1,4-benzoquinona***	1138,67 \pm 205,60a	800,70 \pm 204,20a	1018
(S)-limoneno***	35,87 \pm 6,90a	21,86 \pm 6,40a	1033
5-butil-ciclohexadieno**	3,03 \pm 0,30a	3,12 \pm 0,50a	1085
1-undeceno**	11,52 \pm 1,00a	7,47 \pm 2,1a	1092
2-etil-1,4-benzoquinona***	3415,73 \pm 537,50a	2505,23 \pm 628,20a	1110
4H-1,3-benzodioxin**	60,47 \pm 7,90a	43,58 \pm 9,50a	1121
decanal**	0,88 \pm 0,10a	1,03 \pm 0,10a	1265
hidroquinona**	5,94 \pm 1,10a	7,79 \pm 2,70a	1325
2-metil-1,4-benzenodiol**	25,08 \pm 3,80a	19,66 \pm 4,20a	1338
Sesquiterpeno desconhecido**	3,72 \pm 1,10a	5,19 \pm 1,00a	1400
2-etil-1,4-benzenodiol**	74,85 \pm 10,30a	61,20 \pm 12,90a	1419
3H-Ciclopentapiridazin-3-one**	14,37 \pm 1,50a	11,58 \pm 1,90a	1449
α-amorfenos**	1,66 \pm 0,50a	1,07 \pm 0,40a	1457
acoradieno**	4,10 \pm 1,40a	2,35 \pm 0,60a	1465
γ-muroleno**	2,55 \pm 0,50a	1,06 \pm 0,40b	1473
β-himachaleno**	1,60 \pm 0,20a	2,22 \pm 1,30a	1479
α-curcumeno**	2,28 \pm 0,60a	1,19 \pm 0,80a	1482
α-chamigreno**	0,34 \pm 0,20a	0,43 \pm 0,30a	1504
β-bisaboleno**	8,83 \pm 0,70a	6,32 \pm 1,50a	1508
cupareno**	1,18 \pm 0,20a	0,52 \pm 0,30b	1516
β-sesquifelandreno**	18,24 \pm 2,50a	12,93 \pm 3,70a	1527
Sesquiterpeno desconhecido**	1,03 \pm 0,20a	0,72 \pm 0,30a	1535

* Valores médios calculados a partir de 10 extratos contendo 10 pares de glândulas. Médias seguidas de letras distintas na linha diferem estatisticamente pelo teste T ($P < 0,05$).

** Compostos identificados através do índice de retenção e comparação com o padrão de fragmentação da biblioteca NIST e Wiley.

*** Compostos identificados com comparação com padrões autênticos.

Monoterpenos são compostos raramente encontrados nas glândulas abdominais de tenebrionídeos (Geiselhardt *et al.*, 2009). Porém, Francke & Dettner (2005), descrevem que tais substâncias são muito comuns em outras famílias de coleópteros, como Curculionidae e Scolytidae. Até então, a ocorrência simultânea dos monoterpenos α -pineno, β -pineno e limoneno nas glândulas abdominais, tinha sido reportada por Geiselhardt *et al.* (2009) como uma característica específica da subtribo Stizopina (Tenebrionidae). Fato este, que não corrobora com os resultados encontrados por Mendoza & Saavedra (2013), que identificaram tanto α -pineno quanto limoneno nas glândulas abdominais de *U. dermestoides* e com os resultados encontrados no presente estudo, uma vez que *A. diaperinus* também produz α -pineno, β -pineno e limoneno em suas glândulas abdominais.

4.1.2 Eletroantenografia

Ambos os sexos desencadearam respostas eletroantenográficas somente para três das quinonas presentes tanto nos extratos de glândulas de fêmeas, como nos de machos de *A. diaperinus*, ou seja, 1,4-benzoquinona, 2-metil-1,4-benzoquinona e 2-etil-1,4-benzoquinona (Figura 8).

Assim como no presente estudo, respostas eletroantenográficas às quinonas 2-metil-1,4-benzoquinona e 2-etil-1,4-benzoquinona também foram registradas em outros tenebrionídeos, como *T. castaneum* (Duehl *et al.*, 2011) e *T. confusum* (Verheggen *et al.*, 2007).

4.1.3 Olfatometria: extratos de glândulas abdominais

Nos testes de quimiotaxia, o tempo de residência tanto de fêmeas quanto de machos de *A. diaperinus*, foi maior no tratamento controle (hexano) ($P < 0,05$), quando comparado ao tempo despendido nos braços da arena com

predominância dos voláteis oriundos dos extratos tanto das glândulas abdominais de fêmeas (Figura 9 A e C) quanto de machos (Figura 9 B e D).

Dadas às chances que os insetos tiveram de ir para os braços contendo os odores dos extratos (75%) comparada com o braço controle (25%), é possível comprovar a atividade de repelência provocada por estes compostos na concentração de 0,1 IE.

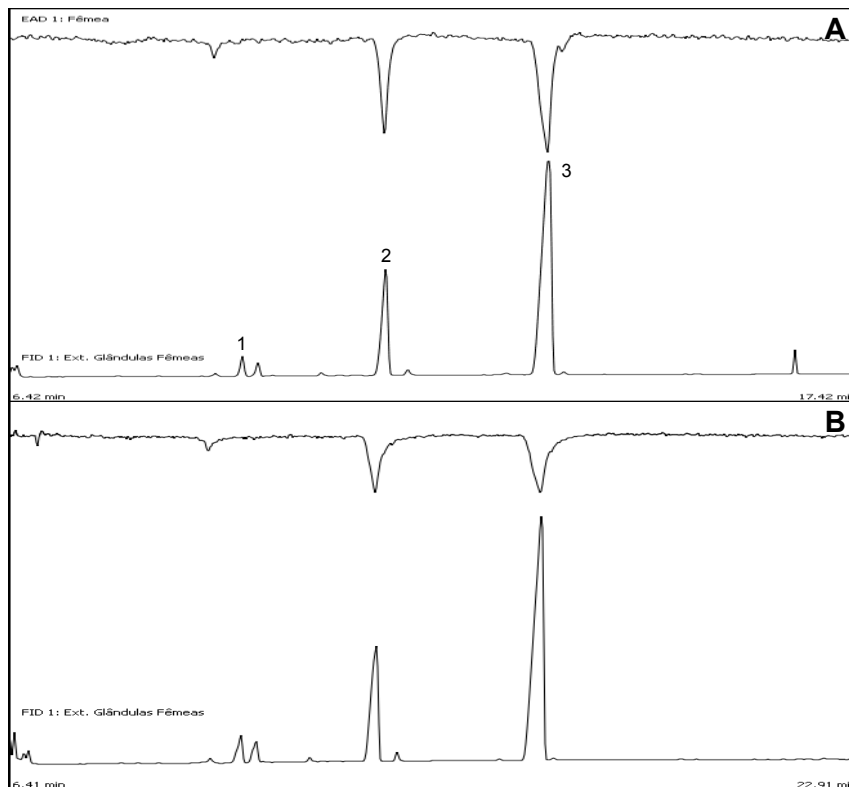


FIGURA 8. Cromatogramas (CG) do extrato das glândulas abdominais ventrais de fêmeas de *Alphitobius diaperinus* com detecção simultânea por DIC (inferior) e EAD (superior) utilizando uma antena de fêmea (A) e macho (B) (n = 6). Os picos 1, 2 e 3 foram identificados por comparação com padrões sintéticos como sendo, 1,4-benzoquinona, 2-metil-1,4-benzoquinona e 2-etil-1,4-benzoquinona.

4.1.4 Olfatometria: mistura sintética

As respostas dos insetos frente à exposição aos voláteis dos três compostos sintéticos: 1,4-benzoquinona, 2-metil-1,4-benzoquinona e 2-etil-1,4-benzoquinona na concentração de 0,1 IE, foram semelhantes as observadas no item 4.1.3 (Figura 10). O tempo de residência tanto de fêmeas quanto de machos

de *A. diaperinus*, foi maior no tratamento controle (hexano) ($P < 0,05$), quando comparado ao tempo despendido nos braços arena com predominância dos voláteis oriundos da mistura sintética.

A ação repelente intraespecífica de substâncias presentes em extratos das glândulas abdominais de *T. castaneum* e *T. confusum* já tinha sido constatada por diversos autores (Faustini & Burkholder, 1986; Tillman, *et al.*, 1999; Verheggen *et al.*, 2007; Duehl *et al.* 2011) De acordo com os mesmos, estes compostos atuam como reguladores populacionais, dispersando a população quando os recursos são limitantes para o desenvolvimento dos organismos em um determinado habitat. Em altas densidades, *T. castaneum* compete por recurso alimentar com outros insetos, nesta situação o mesmo necessita migrar para outros pontos da massa de grãos. Segundo Duehl *et al.* (2011) é neste momento que *T. castaneum* libera a secreção presente nas glândulas abdominais, desencadeando o comportamento de dispersão de coespecíficos.

Ao contrário de *T. castaneum*, *A. diaperinus* não compete diretamente com outros insetos e tampouco enfrenta escassez de alimento e espaço nos ambientes avícolas durante o período do lote de aves. Porém durante o vazio sanitário, período entre lotes, há uma redução drástica no número de insetos dentro das instalações, devido a diminuição da temperatura, umidade e quantidade de alimento disponível no interior da instalação (Salin *et al.*, 2000).

Segundo Salin *et al.* (2000), no período entre lotes as maiores densidades de larvas (último instar), pupas e adultos de *A. diaperinus* se encontram no solo (10 cm de profundidade) de forma dispersa. Após a saída das aves da instalação, o ambiente se torna desfavorável (Salin *et al.*, 2000), pode ser que neste momento alguns indivíduos de *A. diaperinus* agregados evertam a glândula abdominal provocando a dispersão de coespecíficos ou mesmo evitando que

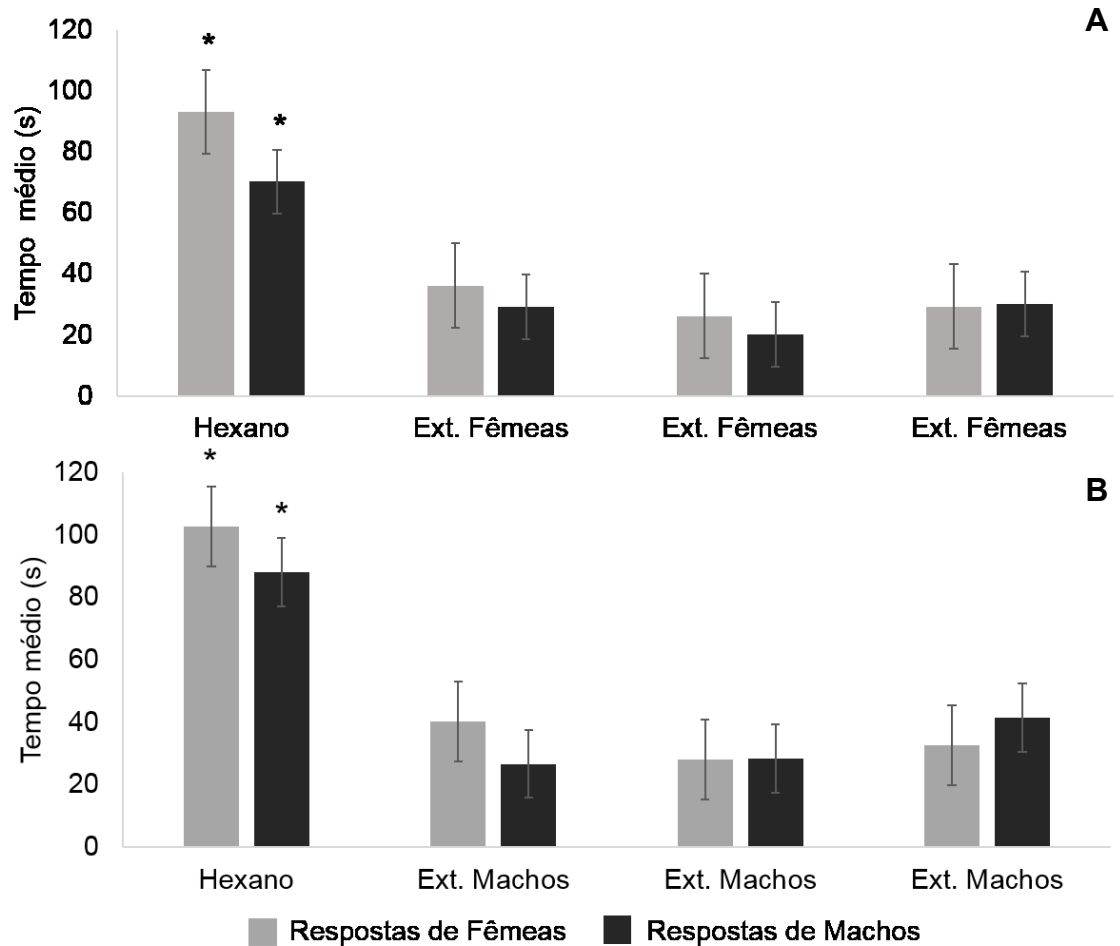


FIGURA 9. Percentagens do tempo de residência de fêmeas e de machos ao hexano e aos extratos (0,1 IE) das glândulas abdominais de fêmeas (A) e machos (B), respectivamente (n=40). EGA = Extrato da Glândula Abdominal. Tempo de observação: 5 min. * Teste de Friedman ($\alpha = 0,05$).

Outra hipótese é que as substâncias presentes nestas glândulas possam ter função defensiva, atuando interespecificamente. De acordo com Dettner (1987), a secreção abdominal está relacionada à defesa destes insetos, principalmente frente ao ataque de predadores. Em situações de perigo, os tenebrionídeos adotam comportamentos distintos para liberação destes compostos (Tschinkel, 1975b). No gênero *Eleodes*, por exemplo, os insetos posicionam o abdome a 60°, evertem as glândulas e ejetam a secreção (Tschinkel, 1975b). Já em membros de Diaperini, a qual pertence *A. diaperinus*, os insetos dobram as pernas e as antenas próximo ao corpo, permanecem

imóveis e em seguida liberam a secreção (Tschinkel, 1975b). A função defensiva destes compostos foi constatada por Peschke & Eisner (1987), que verificaram a ação repelente desta secreção em *B. mucronata* frente a formiga-faraó (*Monomorium pharaonis* Linnaeus), seu predador natural.

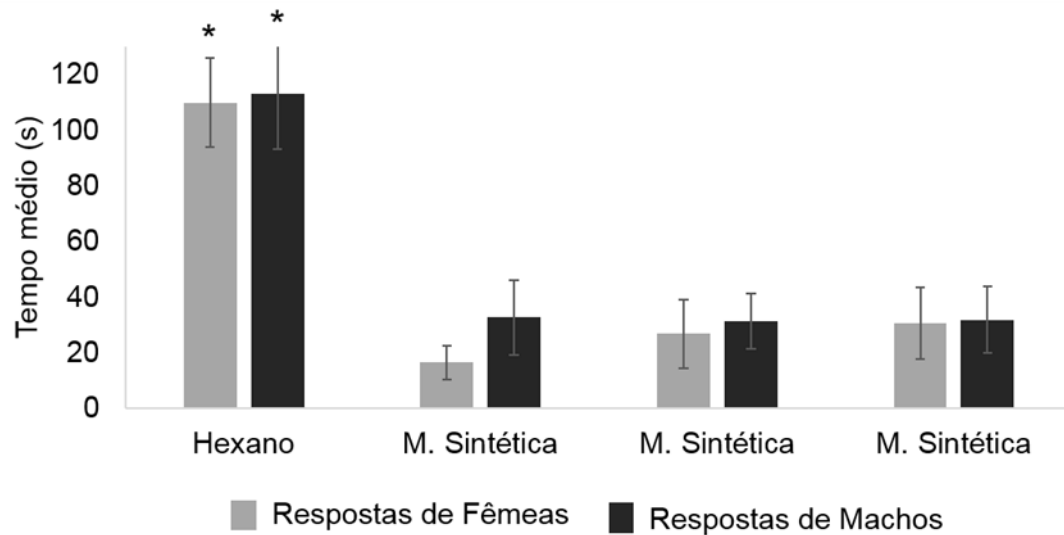


FIGURA 10. Percentagens do tempo de residência de fêmeas e machos de *Alphetobius diaperinus*, em olfatômetro de múltipla escolha (n=40). MS = mistura sintética, composta por 1,4-benzoquinona, 2-metil-1,4-benzoquinona e 2-etil-1,4-benzoquinona (0,1 IE). Tempo de observação: 5 min. * Teste de Friedman ($\alpha = 0,05$).

Foi observado que quando a mistura sintética foi avaliada, o padrão de respostas de *A. diaperinus* foi o mesmo constatado nos testes com os extratos, os quais continuam em sua composição os demais compostos identificados. Este resultado sugere que *A. diaperinus* utilize principalmente estas três quinonas na sua comunicação intraespecífica, enquanto que as demais substâncias, juntamente com as quinonas, poderiam ser responsáveis pelas interações interespecíficas.

4.2 Feromônio de agregação

4.2.1 Análises químicas

Nas aerações de fêmeas e machos de *A. diaperinus* foram encontrados seis compostos macho específicos: (*R*)-limoneno, (*E*)- β -ocimeno, 2-nonanona, (*S*)-linalol, (*R*)-dauceno e (*E,E*)- α -farneseno (Figura 11) os quais estavam presentes em diferentes concentrações (Tabela 2).

Os compostos (*R*)-limoneno, (*E*)- β -ocimeno, 2-nonanona, (*S*)-linalol e (*R*)-dauceno já tinham sido identificados como feromônio de agregação de populações de *A. diaperinus* nos Estados Unidos (Bartelt *et al.*, 2009). Segundo os autores, destas, a 2-nonanona é a única substância sequestrada da fonte alimentar, sendo as demais sintetizadas por machos de *A. diaperinus*.

No presente estudo, além dos cinco compostos previamente identificados, foi registrada a presença de (*E,E*)- α -farneseno. Dentre estes compostos, nenhum foi previamente observado em outras espécies de tenebrionídeos, porém já foram referenciados como componentes do feromônio de outros insetos. Por exemplo, o (*E*)- β -ocimeno ocorre nas secreções abdominais de machos do gênero *Danaus* (Lepidoptera: Nymphalidae) (Komae, 1982); o mesmo também é encontrado nas glândulas Dufour das formigas de correição (*Labidus* spp.) (Hymenoptera: Formicidae) (Keegans *et al.*, 1993). O (*S*)-linalol é um dos componentes do feromônio sexual de *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (Heath *et al.*, 1992). Já a cetona 2-nonanona é produzida por fêmeas de *Molanna angustata* Curtis (Trichoptera: Molannidae) (Löfstedt *et al.*, 2008). Também foram registrados nas secreções defensivas de hemípteros da subordem Heteroptera, o (*R*)-limoneno e o (*S*)-linalol (Aldrich, 1988). Baker *et al.* (1985) constatou a presença de (*E,E*)- α -farneseno no feromônio sexual da mosca-das-frutas *Ceratitis*

capitata Wiedemann (Diptera: Tephritidae). Já o composto (*R*)-Dauceno só possui registro de ocorrência em *A. diaperinus* (Bartelt *et al.*, 2009).

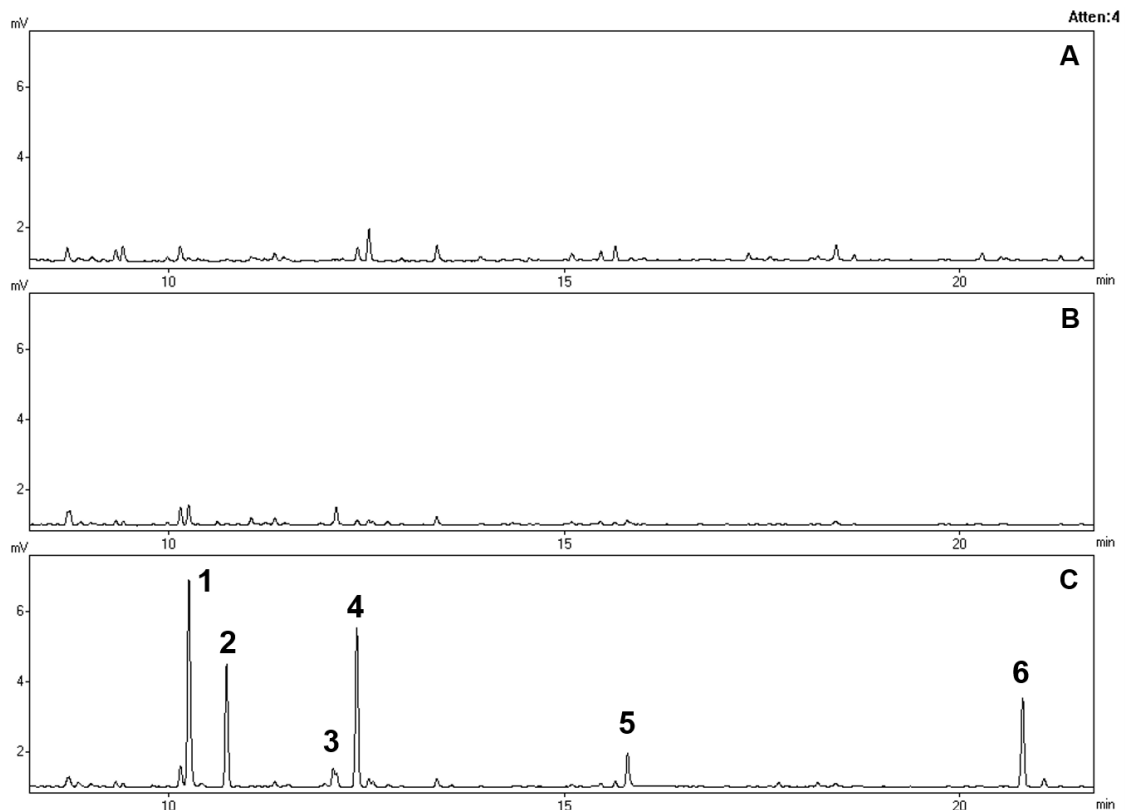


FIGURA 11. Cromatogramas do extrato de aeração do controle (sem insetos) (A), de 200 fêmeas (B) e 200 machos (C) de *Alphitobius diaperinus* por 24 horas. Os números indicam os compostos macho específicos identificados por comparação com padrões autênticos. 1) (*R*)-limoneno, 2) (*E*)- β -Ocimeno, 3) 2-nonanona, 4) (*S*)-linalol, 5) (*R*)-dauceno e 6) (*E,E*)- α -farneseno.

A presença do (*E,E*)- α -farneseno, neste trabalho, caracteriza uma mudança qualitativa no feromônio de *A. diaperinus* identificado anteriormente (Bartelt *et al.* 2009) devido, possivelmente, ao isolamento geográfico das populações dos Estados Unidos em relação as do Brasil. Também foi constatado que o composto de maior concentração no presente estudo foi o (*S*)-linalol, diferente do que acontece nas populações estudadas pelos últimos autores, nas quais a substância majoritária foi o (*E*)- β - ocimeno.

TABELA 2. Quantidade média (ng/inseto) \pm (EP) e índice de retenção dos compostos feromoniais produzidos por machos de *Alphitobius diaperinus* (n = 3).

Compostos	Quantidade	Índice de retenção
(R)-limoneno	45 \pm 10,4 ng/inseto	1030
(E)- β -ocimeno	30 \pm 6,9 ng/inseto	1050
2-nonanona	7 \pm 1,4 ng/inseto	1091
(S)-linalol	50 \pm 12,85 ng/inseto	1103
(R)-dauceno	15 \pm 1,2 ng/inseto	1378
(E,E)- α -farneseno	45 \pm 10,75 ng/inseto	1508

Diferenças feromoniais entre populações de mesma espécie isoladas geograficamente, também já foram constatadas em outros coleópteros, tais como *I. pini* (Lanier *et al.*, 1980). Neste estudo os autores relataram que os insetos provenientes de Nova York (EUA) produzem ambos isômeros (R e S) do ipsdienol (65:35) como feromônio de agregação, enquanto que os de Idaho (EUA) produzem somente o (S). Nestes, ocorre inibição das respostas comportamentais de ambos os sexos na presença do isômero (R). Segundo Miller *et al.*, (1989) tais diferenças interpopulacionais se devem, principalmente, aos níveis do composto precursor do ipsdienol (mirceno) presente no tecido da planta hospedeira.

No curculionídeo *R. obscurus*, as variações populacionais se devem a fatores genéticos (Giblin-Davis *et al.*, 2000). De acordo com os autores, machos de populações do Hawaii (EUA) produzem um único composto macho específico (2-metil-4-octanol), enquanto que em insetos oriundos da Austrália, além deste, também sintetizam os álcoois (E2)-6-metil-2-hepten-4-ol e 2-metil-4-heptanol.

Em estudos iniciais sobre o desenvolvimento de técnicas de marcadores moleculares para identificação de *A. diaperinus*, Silva (2010), indicaram variabilidade genética entre populações provenientes dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Não se sabe, no entanto, se esta variação gênica pode influenciar na síntese do feromônio dessa espécie.

4.2.2 Olfatometria: extratos de machos

Tanto as fêmeas ($\chi^2 = 20,000$; gl = 1; $P < 0,0001$), quanto os machos ($\chi^2 = 9,800$; gl = 1; $P = 0,0017$), foram mais responsivos ao feromônio de agregação, quando comparados ao tratamento controle (Figura 12).

4.2.3 Olfatometria: mistura sintética

O mesmo padrão de resposta verificado nos testes com os extratos de aeração (item 4.2.2) foi observado quando foram comparadas as respostas dos insetos a mistura sintética total (MT). Tanto as fêmeas ($\chi^2 = 7,200$; gl = 1; $P = 0,0073$) quanto os machos ($\chi^2 = 7,200$; gl = 1; $P = 0,0073$), foram mais responsivos a mistura feromonal sintética, quando comparados ao hexano (Figura 13).

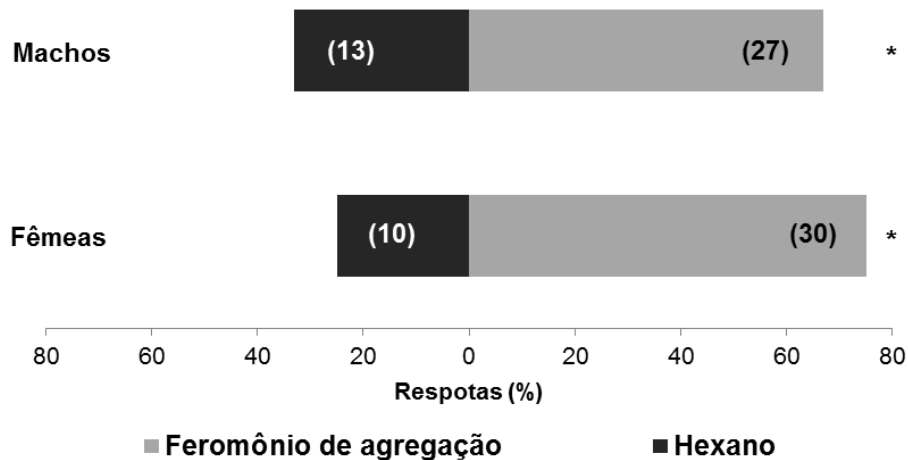


FIGURA 12. Percentagens de respostas de ambos os sexos de *Alphitobius diaperinus* ao extrato de aeração de machos e ao controle (hexano) em olfatômetro Y. Algarismos dentro das barras referem-se ao número de indivíduos que responderam aos tratamentos. *Diferença significativa através da análise do Qui-quadrado ($\alpha = 0,05$).

A fim de chegar a uma mistura atrativa para ambos os sexos com um número menor de substâncias, os compostos do feromônio de agregação de *A. diaperinus* foram retirados um a um e as diferentes misturas foram testadas em olfatometria (Figura 14).

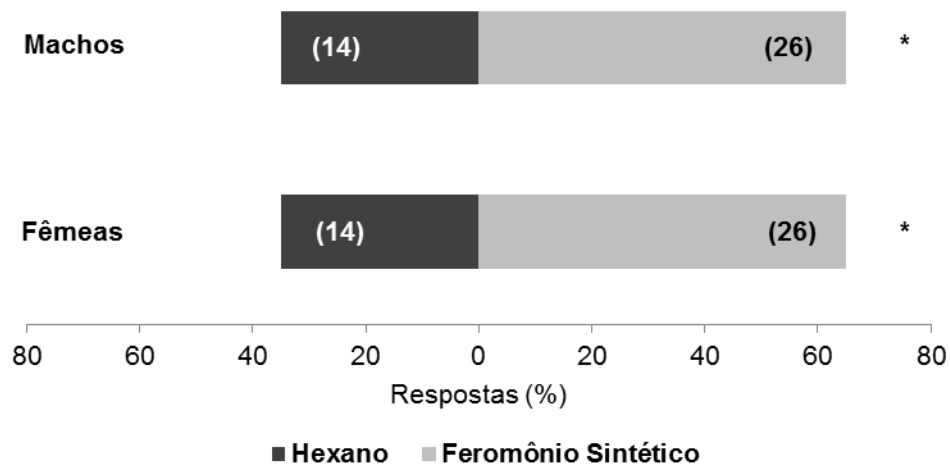


FIGURA 13. Percentagens de respostas de ambos os sexos de *Alphitobius diaperinus* a mistura feromonal sintética (MT) [(R)-limoneno + (Z)- β -ocimeno + 2-nonanona + (S)-linalol + (R)-dauceno + (E,E)- α -farneseno] e ao controle (hexano) em olfatômetro Y. Algarismos dentro das barras referem-se ao número de indivíduos que responderam aos tratamentos. *Diferença significativa através da análise do Qui-quadrado ($\alpha = 0,05$).

Quando o composto (Z)- β -ocimeno (Figura 14, A) foi retirado da MT, tanto fêmeas ($\chi^2 = 9,800$; gl = 1; P = 0,0017), quanto machos ($\chi^2 = 12,800$; gl = 1; P = 0,0003) continuaram respondendo de forma significativa para a mistura em relação ao controle. Em virtude disso, o composto foi excluído das misturas seguintes. Em seguida o composto retirado da mistura foi o (S)-linalol, sem que houvesse diferenças significativas nas respostas de fêmeas ($\chi^2 = 0,200$; gl = 1; P = 0,655) e machos ($\chi^2 = 0,800$; gl = 1; P = 0,371), em relação ao controle (hexano) (Figura 14, B). O mesmo padrão de comportamento ocorreu quando foram retirados os compostos: (R)-dauceno, respostas de fêmeas ($\chi^2 = 0,00$; gl = 1; P = 1,000) e machos ($\chi^2 = 1,067$; gl = 1; P = 0,302) (Figura 14, C); (R)-limoneno, fêmeas ($\chi^2 = 0,267$; gl = 1; P = 0,606) e machos ($\chi^2 = 0,00$; gl = 1; P = 1,000) (Figura 14, D); 2-nonanona, fêmeas ($\chi^2 = 1,067$; gl = 1; P = 0,302) e machos ($\chi^2 =$

0,267; $gl = 1$; $P = 0,606$) (Figura 14, E) e (*E,E*)- α -farneseno, fêmeas ($\chi^2 = 0,267$; $gl = 1$; $P = 0,606$) e machos ($\chi^2 = 0,00$; $gl = 1$; $P = 1,000$) (Figura 14, F).

De acordo com os resultados obtidos, dos seis compostos macho específicos identificados em *A. diaperinus*, cinco [(*R-S*)-linalol, (*R*)-dauceno, (*R*)-limoneno, 2-nonanona e (*E,E*)- α -farneseno] foram necessários para promover a atração de ambos os sexos. Porém, uma vez que (*Z*)- β -ocimeno, não é o produzido por *A. diaperinus*, a presença do isômero (*E*)- β -ocimeno poderia potencializar a atratividade.

O feromônio de agregação da maioria das espécies de coleópteros é composto por diversas substâncias, sendo estas responsáveis por promover a atração de ambos os sexos para sítios de alimentação e cópula (Silverstein & Young, 1976). Porém, há algumas exceções, como em *T. castaneum*, *T. confusum* (4,8-dimetildecanal) (Suzuki, 1980) e *Diaprepes abbreviatus* Linnaeus (Coleoptera: Curculionidae) [metil-(*E*)-3-(2-hidroxi-etil)-4-metil-2-pentenoato] (Lapointe *et al.*, 2012), em que os machos produzem um único composto como feromônio de agregação.

No curculionídeo *Sternecus subsignatus* Boheman, os machos produzem sete compostos constituintes do feromônio de agregação, contudo testes de olfatométrica revelaram que somente o composto majoritário (*E*-2-3,3-dimetilciclohexilideno-etanol) é suficiente para que um grande número de fêmeas e machos seja atraído (Ambrogi *et al.*, 2012). O mesmo ocorre no cerambicídeo *Rosalia funebris* Mots, em que o macho produz como feromônio de agregação quatro compostos, destes, o majoritário (*Z*-3-decenil *E*-2-hexenoato), promove a atração de ambos os sexos isoladamente (Ray *et al.*, 2009). Ao contrário das espécies citadas acima, os machos de *Ips paraconfusus* Lanier (Coleoptera:

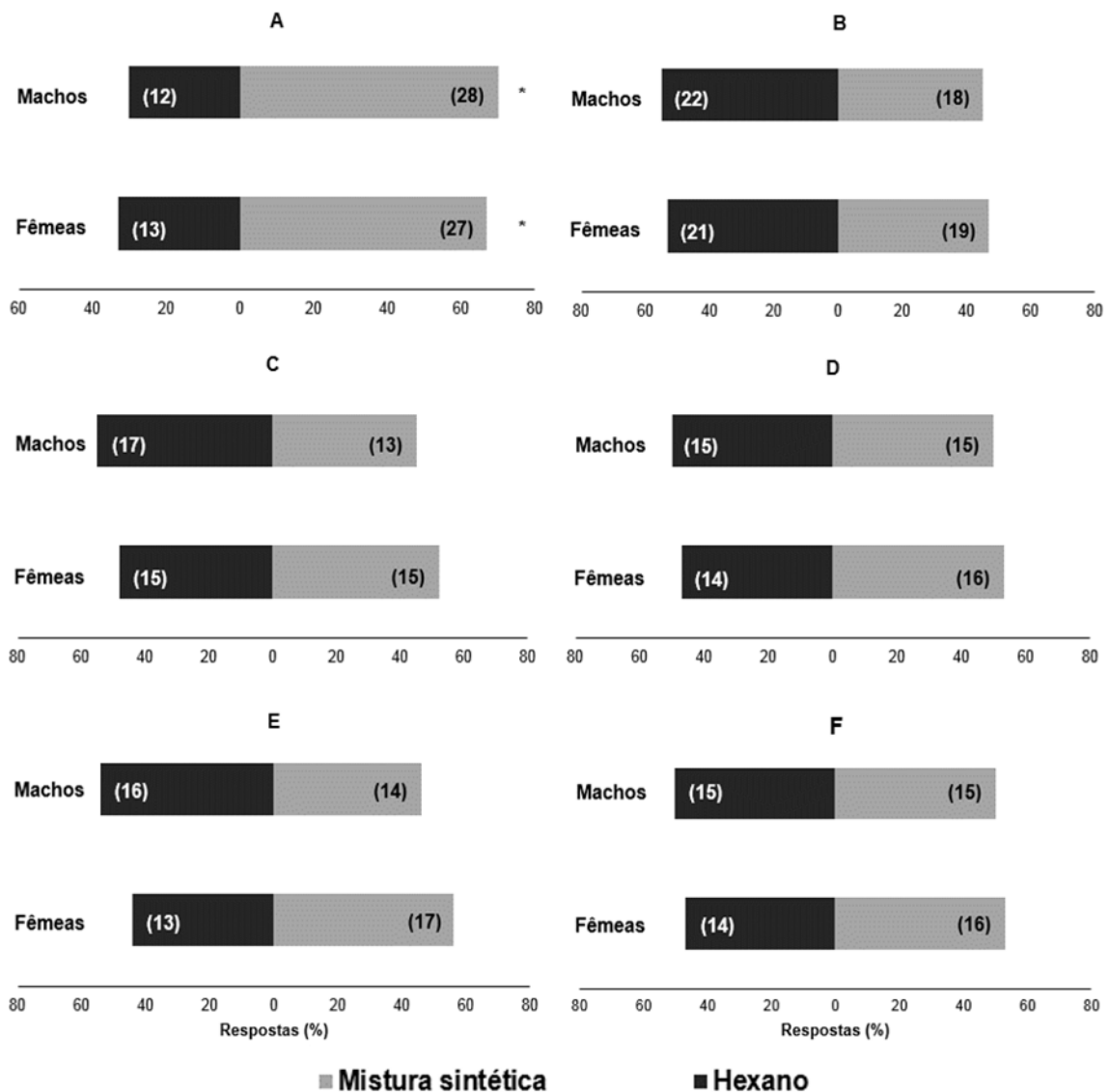


FIGURA 14. Percentagens de respostas de ambos os sexos de *Alphitobius diaperinus* a misturas feromonais sintéticas e ao controle (hexano) em olfatômetro Y. A) MT menos (Z)- β -ocimeno, B) MT menos (Z)- β -Ocimeno e (S)-Linalol, C) MT menos (Z)- β -Ocimeno e (R)-dauceno, D) MT menos (Z)- β -ocimeno e (R)-limoneno, E) MT menos (Z)- β -ocimeno e 2-nonanona, F) MT menos (Z)- β -ocimeno e (E,E)- α -farneseno. MT= Mistura sintética Total [(R)-limoneno + (Z)- β -ocimeno + 2-nonanona + (S)-linalol + (R)-dauceno + (E,E)- α -farneseno]. Algarismos dentro das barras referem-se ao número de indivíduos que responderam aos tratamentos. *diferença significativa através da análise do Qui-quadrado ($\alpha = 0,05$).

Scolytidae) produzem três compostos específicos, e só há atração de ambos os sexos na presença de todos (Silverstein & Young, 1976).

Conforme relatado, pode haver uma variação na percepção de coleópteros em relação aos compostos feromonais. Este fato está relacionado, principalmente, a quantidade de receptores presentes nas antenas dos insetos e a especificidade dos mesmos (Breer, 1996; Pelosi *et al.*, 2005). Em algumas espécies, como *S. subsignatus* (Ambrogi *et al.*, 2012), a percepção da substância majoritária já é suficiente para que ocorra a despolarização da membrana dendrítica, desencadeando uma resposta motora. Isto se deve a presença de grandes quantidades de proteínas receptoras específicas (*Pheromone Binding Proteins*). Já em outras, como *I. paraconfusus* (Silverstein & Young, 1976) e *A. diaperinus*, outras proteínas com diferentes graus de especificidade (*General Odor-Binding Proteins*), possivelmente, precisam ser ativadas de forma conjunta e sincrônica para que ocorra a transdução do sinal químico (Breer, 1996) e o mesmo padrão de resposta motora seja observado.

5 CONCLUSÕES

- Tanto fêmeas quanto machos de *A. diaperinus* produzem 26 compostos nas suas glândulas abdominais, destes, somente as quinonas 1,4-benzoquinona, 2-metil-1,4-benzoquinona e 2-etil-1,4-benzoquinona são bioativas nas antenas dos insetos.
- Os extratos das glândulas abdominais de *A. diaperinus* e a solução sintética contendo 1,4-benzoquinona, 2-metil-1,4-benzoquinona e 2-etil-1,4-benzoquinona provocam comportamento de repelência de coespecíficos.
- Machos de *A. diaperinus* produzem seis compostos específicos. (*R*)-limoneno, (*Z*)- β -ocimeno, 2-nonanona, (*S*)-linalol, dauceno e (*E,E*)- α -farneseno.
- Tanto o extrato quanto a mistura sintética total das substâncias do feromônio de agregação de *A. diaperinus* são atrativos para ambos os sexos.
- Na ausência do composto (*Z*)- β -ocimeno, a mistura sintética de (*R*)-limoneno, 2-nonanona, (*S*)-linalol, (*R*)-dauceno e (*E,E*)- α -farneseno é atrativa para ambos os sexos de *A. diaperinus*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi possível obter dados relevantes relacionados à ecologia química de *A. diaperinus*. Os resultados apresentados podem auxiliar na elaboração de uma ferramenta de controle com base na utilização de feromônios para o manejo comportamental desta praga em aviários.

As substâncias repelentes, por exemplo, poderiam ser formuladas e utilizadas em torno de áreas críticas dos aviários, como os comedouros, onde há grande concentração de insetos e intensa atividade alimentar de aves. Da mesma forma, a população do cascudinho poderia ser manejada com o feromônio de agregação. Neste caso, armadilhas com este semioquímico poderiam ser instaladas em aviários, no período entre lotes, para o monitoramento do inseto. Este procedimento seria interessante, principalmente, após a utilização de alguma estratégia para mitigação da praga, como a aplicação de inseticidas. Desta forma, seria possível avaliar a eficiência do(s) método(s) e manejar os aviários de forma mais racional e criteriosa.

É importante enfatizar que a viabilização desta ferramenta no manejo comportamental do *A. diaperinus* depende do envolvimento multidisciplinar de diversas áreas afins, as quais devem participar, através de seus conhecimentos próprios, de um esforço conjunto no desenvolvimento e aprimoramento desta prática. Deve-se ter claro que o maior objetivo deste método é a redução de intoxicações e contaminações, maior equilíbrio ecológico, redução de custos e

aumento da produtividade. Sendo assim, diversos bioensaios ainda devem ser conduzidos a campo para que esta prática se torne viável, aumentando a sustentabilidade ambiental e econômica na produção avícola.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRICH, J. R. Chemical ecology of the heteroptera. **Annual Reviews of Entomology**, Palo Alto, v. 33, p. 211-238, 1988.

ALPIZAR, D. et al. Management of *Cosmopolites sordidus* and *Metamasius hemipterus* in banana by pheromone-based mass trapping. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 38, n. 3, p. 245–252, 2012.

ALVES, L. F. A. et al. Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em adultos de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) Coleoptera: Tenebrionidae) em aviários comerciais em Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 793-795, 2004.

AMBROGI, B. G. et al. Identification of male-produced aggregation pheromone of the curculionid beetle *Sternecus subsignatus*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 38, n. 3, p. 272-277, 2012.

ARBOGAST, R. T. et al. Monitoring insect pests in retail stores by trapping and spatial analysis. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 5, p. 1531-1542, 2000.

ARNAUD, L. et al. Is dimethyldecanal a common aggregation pheromone of Tribolium flour beetles? **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 28, n. 3, p. 523–532, 2002.

ATTYGALLE, A. B. et al. Defensive secretion of *Tenebrio molitor* (Coleoptera:Tenebrionidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 17, n. 4, p. 805-809, 1991.

AXTELL, R. C.; ARENDS, J. J. Ecology and management of arthropod pests of poultry. **Annual Reviews of Entomology**, Palo Alto, v. 35, p. 101-126, 1990.

AYRES, M. et al. **BioEstat 4.0: Aplicações estatísticas nas áreas da ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; MCT; Imprensa Oficial do Estado do Pará, 2006. 324 p.

Obs: fora da ordem alfabética.

BAKER, R. et al. Isolation and identification of the sex pheromone of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wied). **Journal of the Chemical Society, Chemical communications**, London, v. 73, n. 12, p. 824-825, 1985.

BARTELT, R. J. et al. Male-Produced aggregation pheromone of the lesser mealworm beetle, *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, n. 4, p. 422-434, 2009.

BATISTA-PEREIRA, L. G. et al. Isolation, Identification, Synthesis, and Field Evaluation of the Sex Pheromone of the Brazilian Population of *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 32, n. 5, p. 1085-1099, 2006.

BENTO, J. M. S. et al. Field trapping of *Migdolus fryanus* Westwood (Coleoptera: Cerambycidae) using natural sex pheromone. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 18, n. 2, p. 245-251, 1992.

BREER, H. **Insect Pheromone Research: new directions**. Molecular mechanisms of pheromone reception in insect antennae. New York: Chapman and Hall, 1996. p. 115-130.

BRYNING, G. P. et al. Identification of a sex pheromone from male yellow mealworm beetles, *Tenebrio molitor*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, n. 11, p. 2721–2730, 2005.

CHERNAKI-LEFFER, A. M. et al. Controle do Cascudinho. **Avicultura Industrial**, v. 1094, p. 22-25, 2001.

CHERNAKI-LEFFER, A. M.; ALMEIDA, L. M. Exigências térmicas, período de desenvolvimento e sobrevivência de imaturos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer)(Coleoptera:Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 365-368, 2001a.

CHERNAKI, A. M.; ALMEIDA L. M. Morfologia dos estágios imaturos e do adulto de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 351-363, 2001b.

CHERNACKI-LEFFER, A. M. et al. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no Oeste do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 4, n. 3, p. 243-247, 2002.

CHERNACKI-LEFFER, A. M. et al. Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera, Tenebrionidae) to cypermethrin, dichlorvos and triflumuron in southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 125–128, 2011.

CHOI, K. S. et al. Sex pheromone composition of *Ascotis selenaria* (Lepidoptera: Geometridae) and its regional variation in Korea. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 15, n. 3, p. 413–418, 2012.

CORRÊA, A. G.; SANT'ANA, J. **Produtos naturais no controle de insetos**. Ecologia química de insetos. 2. ed. São Carlos: UdUFSCar, 2007. p. 9-11.

- CYSNE, A. Q. Flutuação populacional de *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) em palmeiras oleíferas no Amazonas. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 43, n. 2, p.197-202, 2013.
- DESPINS, J. L. et al. Construction profiles of high rise caged layer houses in association with insulation damage caused by the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) in Virginia. **Poultry Science**, Champaign, v. 66, n. 2, p. 243 – 250, 1987.
- DESPINS, J. L. et al. Transmission of enteric pathogens of turkeys by darkling beetle larva (*Alphitobius diaperinus*). **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 3, p. 61-65, 1994.
- DESPINS, J. L.; AXTELL, R. C. Feeding behavior and growth of broiler chicks fed larvae of the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. **Poultry Science**, Champaign, v. 74, p. 331-336, 1995.
- DETTNER, K. Chemosystematics and evolution of beetle chemical defenses. **Annual Reviews of Entomology**, Palo Alto, v. 32, p. 17-48, 1987.
- DUEHL, A. J. et al. Density-related volatile emissions and responses in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 37, n. 5, p. 525-532, 2011.
- DUNFORD, J. C.; KAUFMAN, P. E. Lesser Mealworm, Litter Beetle, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae). **Entomology and Nematology Department**, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Gainesville, Fla, USA, 2006.
- EL-SAYED, A. M. et al. Geographic variation in pheromone chemistry, antennal electrophysiology, and pheromone-mediated trap catch of north American populations of the *Obliquebanded Leafroller*. **Environmental Entomology**, v. 32, p. 470-476, 2003.
- ESQUIVEL, J. F. et al. Improved visualization of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)-Part I: Morphological features for sex determination of multiple stadia. **Psyche: A Journal of Entomology**, Cambridge, v. 2012, 7 p., 2012.
- FAUSTINI, D. L.; BURKHOLDER, W. E. Quinone-aggregation pheromone interaction in the red flour beetle. **Animal Behavior**, v. 35, n. 2, p. 601-603, 1986.
- FERNANDES, W. D. et al. Between-season attraction of cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae) adults by its aggregation pheromone. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 229-234, 2001.
- FRANCKE, W.; DETTNER, K. Chemical signalling in beetles. **Topics in current chemistry**, v. 240, p. 85-166, 2005.
- GEISELHARDT, S. et al. 1-Tridecene: Male-produced sex pheromone of the tenebrionid beetle *Parastizopus transgaripepinus*. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 95, n. 3, p. 247–251, 2008.

- GEISELHARDT, S. et al. Chemical composition and pheromonal function of the defensive secretions in the subtribe Stizopina (Coleoptera, Tenebrionidae, Opatrini). **Chemoecology**, New York, v. 19, n. 1, p. 1–6, 2009.
- GIBLIN-DAVIS, R. M. et al. Aggregation pheromones of two geographical isolates of the New Guinea sugarcane weevil, *Rhabdoscelus obscurus*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, n. 12, p. 2763-2780, 2000.
- GROOT, A. T. et al. Host strain specific sex pheromone variation in *Spodoptera frugiperda*. **Frontiers in Zoology**, v. 5, n. 20, p. 13, 2008.
- HAPP, G. M. Quinone and hydrocarbon production in the defensive glands of *Eleodes longicollis* and *Tribolium castaneum* (Coleoptera:Tenebrionidae). **Journal of Insect Physiology**, London, v. 14, n. 12, p. 1821-1837, 1968.
- HASSEMER, M. J. et al. Susceptibilidade de *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae) a inseticidas piretróides. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 24., 2012, Curitiba, PR. **Anais...** Curitiba: [s.n.], 2012.
- HAZELEGER, W. C. et al. Darkling Beetles (*Alphitobius diaperinus*) and Their Larvae as Potential Vectors for the Transfer of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica* Serovar Paratyphi B Variant Java between Successive Broiler Flocks. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 22, p. 6887–6891, 2008
- HEATH, R. R. et al. Identification of male cabbage looper sex pheromone attractive to females. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 18, n. 3, p. 441-453, 1992.
- HUANG, Y. et al. Geographic variation in sex pheromone of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*, in Japan. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 24, n. 12, p. 2079-2088, 1998.
- JAPP, A. K. et al. Importância e medidas de controle para *Alphitobius diaperinus* em aviários. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1668-1673, 2010.
- KEEGANS, S. J. et al. Volatile glandular secretions of three species of new world army ants, *Eciton burchelli*, *Labidus coecus* and *Labidus praedator*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, n. 11, p. 2705-2719, 1993.
- KOMAE, H. Major components in the hairpencil secretions of danaid butterflies from far east Asia. **Biochemical Systematics and Ecology**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 181-183, 1982.
- LAMBKIN, T. A. **Investigations into the management of the darkling beetle**. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. 2001. RIRDC. Publication number 01/151 online, 2001.

- LANIER, G. N. et al. *Ips pini*: The basis for interpopulational differences in pheromone biology. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 6, n. 3, p. 677-687, 1980.
- LAPOINTE, S. L. et al. Identification and synthesis of a male-produced pheromone for the neotropical root weevil *Diaprepes abbreviatus*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 38, p. 408-417, 2012.
- LASSANCE, J. M. et al. Allelic variation in a fatty-acyl reductase gene causes divergence in moth sex pheromones. **Nature**, v. 466, n. 7305, p. 486-491, 2010.
- LIMA JUNIOR, I. S. et al. Evaluation of the Boll Weevil *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera:Curculionidae) Suppression Program in the State of Goiás, Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 42, p. 82-88, 2013.
- LÖFSTEDT, C. et al. Identification of a sex pheromone produced by sternal glands in females of the caddisfly *Molanna angustata* Curtis. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 34, n. 2, p. 220-228, 2008.
- MAKI, E. C. Evaluation of mass trapping and mating disruption for managing *Prionus californicus* (Coleoptera: Cerambycidae) in hop production yards. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 104, n. 3, p. 933-938, 2011.
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Contém informações institucionais, técnicas, notícias e publicações. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/produtos-veterinarios>>. Acesso em: 30 jan. 2014.
- MCELFRESH, J. S.; MILLAR, J. G. Geographic variation in the pheromone system of the saturniid moth *Hemileuca englaterina*. **Ecology**, v. 82, p. 3505-3518, 2001.
- MENDOZA, M. D. L.; SAAVEDRA, A. S. Chemical composition and anti-irritant capacity of whole body extracts of *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Revista de la Facultad de Química Farmacéutica – Universidad de Antioquia, Colombia**, v. 20, n. 1, p. 41-48, 2013.
- MILLER, D. R. et al. Inter- and intrapopulation variation of the pheromone, Ipsdienol produced by male pine engravers, *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 15, n. 1, p. 233-247, 1989.
- MILONAS, P. G. et al. Optimization of pheromone trapping method for click beetles (*Agriotes* spp.) in Greece. **Phytoparasitica**, v. 38, n. 5, p. 429–434, 2010.
- NAVARRO, D. M. do A. F. et al. Aspectos práticos relacionados ao uso do Rincoforol, o feromônio de agregação da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palamarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) no controle de pragas do coqueiro. Análise de sua eficiência em campo. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 32-36, 2002.
- NUEZ, F. C. et al. Identificação de gêneros de fungos em *Alphitobius diaperinus* (cascudinho) oriundos de granjas avícolas. In: CONGRESSO INTERNO DE

- INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP, 15., 2007, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 2007.
- PAIVA, D. P. de. Controle de moscas e cascudinhos. Desafios na produção Agrícola. In: SIMPÓSIO SOBRE RESÍDUOS DA PRODUÇÃO AVÍCOLA. EMBRAPA SUÍNOS E AVES, 1., 2000, Concórdia, Brasil. **Anais...** Concórdia: [s.n.], 2000. p. 21-26.
- PELOSI, P. et al. Diversity of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in insects. **Chemical Senses**, v. 30, p. 291-292, 2005.
- PESCHKE, K.; EISNER, T. Defensive secretion of the tenebrionid beetle, *Blaps mucronata*: Physical and chemical determinants of effectiveness. **Journal of Comparative Physiology A.**, Berlim, v. 161, n. 3, p. 377-388, 1987.
- PINTO, D. M. **Comparação de métodos para monitorar populações de *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleóptera: Tenebrionidae) e ocorrência da comunidade de artrópodes em granja avícola, em Pelotas, RS.** 2005. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.
- RAY, A. M. et al. Male-produced aggregation pheromone of the cerambycid beetle *Rosalia funebris*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, n. 1, p. 96-103, 2009.
- SALIN, C. et al. Spatial distribution of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera:Tenebrionidae) in the soil of a poultry house along a breeding cycle. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 36, n. 2, p. 107-115, 2000.
- SANTOS, M. A. T. dos et al. Piretróides: Uma Visão Geral. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara. v. 18, n. 3, p. 339-349, jul./set. 2007.
- SILVA, P. R. Q. Análise da variabilidade genética de *Alphitobius diaperinus* utilizando marcadores moleculares. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v. 8, n. 2, p. 55-68, 2010.
- SILVERSTEIN, R. M.; YOUNG, J. C. Insects generally use multicomponent pheromone. In: **Pest Management with Insect Sex Attractants**. Washington, DC: American Chemical Society, 1976.
- SONG, L. W. et al. Field responses of the Asian larch bark beetle, *Ips subelongatus*, to potencial aggregation pheromone components: disparity between two populations in northeastern China. **Insect Science**, v. 18, n. 3, p. 311-319, 2011.
- SUZUKI, T. 4,8-Dimethyldecanal: The aggregation pheromone of the fliDim beetles, *Tribolium castaneum* and *T. confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Agricultural Biology Chemistry**, v. 44, p. 2519–2520, 1980.
- TANNERT, W.; HIEN, B. C. Nachweis und Funktion eines “Versammlungsduftstoffes” und eines “Alarmduftstoffes” bei *Blaps mucronata*

Latr., 1804 (Coleopt.-Tenebrionidae). **Biologisches Zentralblatt**, v. 92, p. 601–612, 1973.

TILLMAN, J. A. et al. Insect Pheromones – an overview of biosynthesis and endocrine regulation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 481-514, 1999.

TSENG, Y. L. et al. Morphology and chemistry of the odoriferous gland of lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Annual Entomology Society of America**, v. 64, p. 425-430, 1971.

TSCHINKEL, W. R. A comparative study of the chemical defensive system of tenebrionid beetles: III Morphology of the glands. **Journal of Morphology**, New York, v. 145, p. 355-370, 1975a.

TSCHINKEL, W. R. A comparative study of the chemical defensive system of tenebrionid beetles: Defensive behavior and ancillary features. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 68, n. 3, p. 439-453, 1975b.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. Contém informações institucionais, técnicas, notícias e publicações. Disponível em: <<http://www.brazilianchicken.com.br/home/publicacoes>>. Acesso em: ago. 2013.

VERHEGGEN, F. et al. Electrophysiological and Behavioral Activity of Secondary Metabolites in the Confused Flour Beetle, *Tribolium confusum*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 33, n. 3, p. 525–539, 2007.

VITTORI, J. et al. *Alphitobius diaperinus* como veiculador de *Clostridium perfringens* em granjas avícolas do interior paulista – Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 894-896, 2007.

WITZGALL, P. et al. Sex pheromone and their impact on pest management. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 36, n. 1, p. 80–100, 2010.

APÊNDICE 1. Índice de Retenção de Kováts

O uso de índices de retenção pode ser uma alternativa para a identificação de compostos orgânicos com estrutura química semelhante. O índice mais conhecido é o de Kováts que é calculado com relação a uma série de padrões de hidrocarbonetos de cadeias lineares (Marques *et al.*, 2000). O índice de retenção de Kováts pode ser definido como cem vezes um número hipotético, que é igual ao número de átomos de carbono de um alcano saturado de cadeia normal, que tem o mesmo tempo de retenção ajustado que o composto, cujo índice está sendo calculado. Este índice é relativo, dessa forma, pode ser reproduzido usando a mesma fase estacionária em diferentes equipamentos e então, comparados. Para se determinar o índice de retenção de outros compostos em relação aos padrões, deve-se especificar as condições experimentais, tais como, fase estacionária, temperatura e outros (Marques *et al.*, 2000; Pherobase, 2013). No presente estudo, o cálculo foi realizado através da seguinte equação:

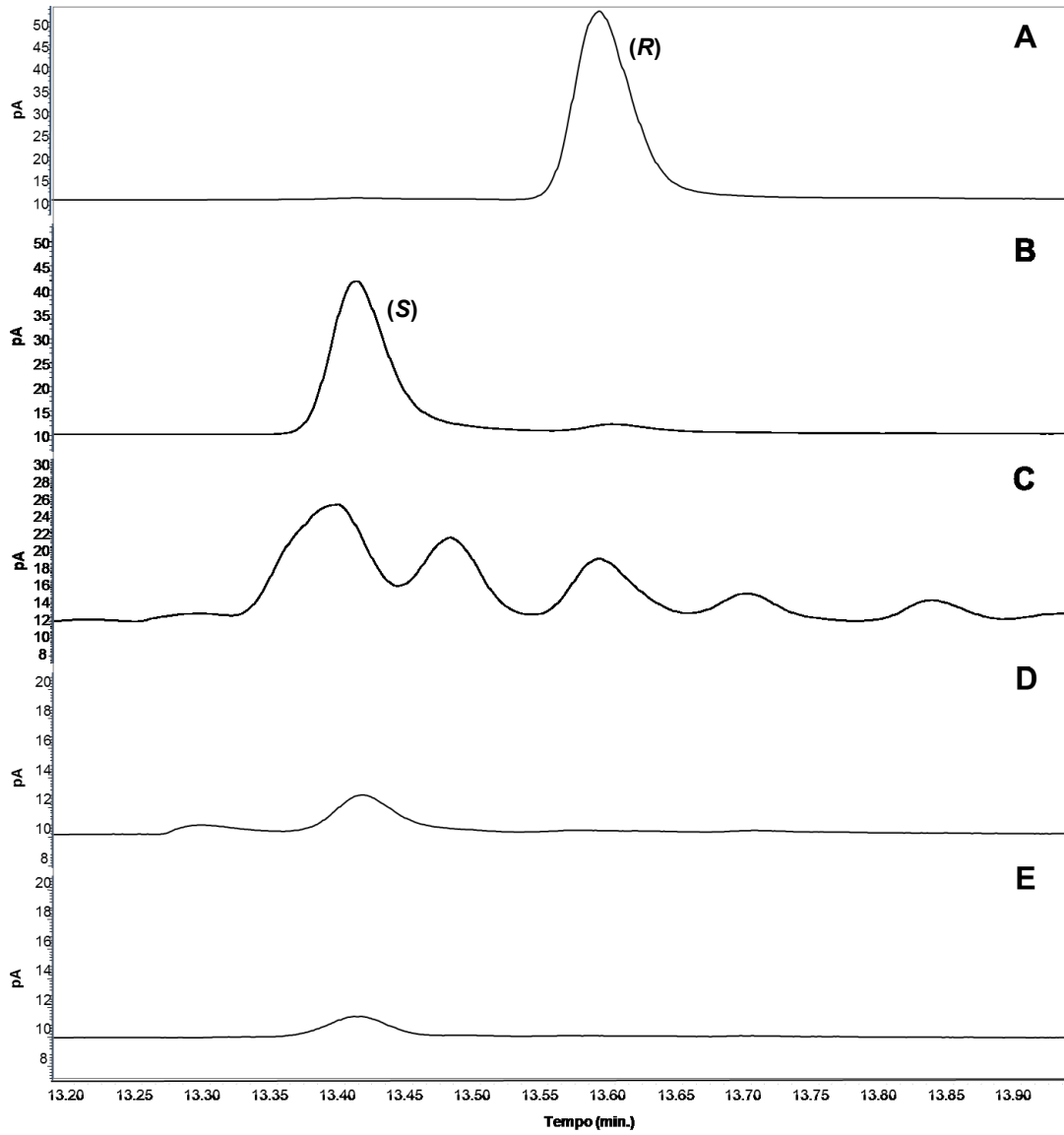
$$KI = 100 * n + 100 * (N-n) * \frac{tr_x - tr_n}{tr_N - tr}$$

Onde n é o número de carbonos do n-alcane, tr_x é o tempo de retenção do padrão, tr_n é o tempo de retenção do alcano imediatamente anterior ao padrão, e tr_N o tempo de retenção do n-alcane localizado imediatamente após o padrão avaliado.

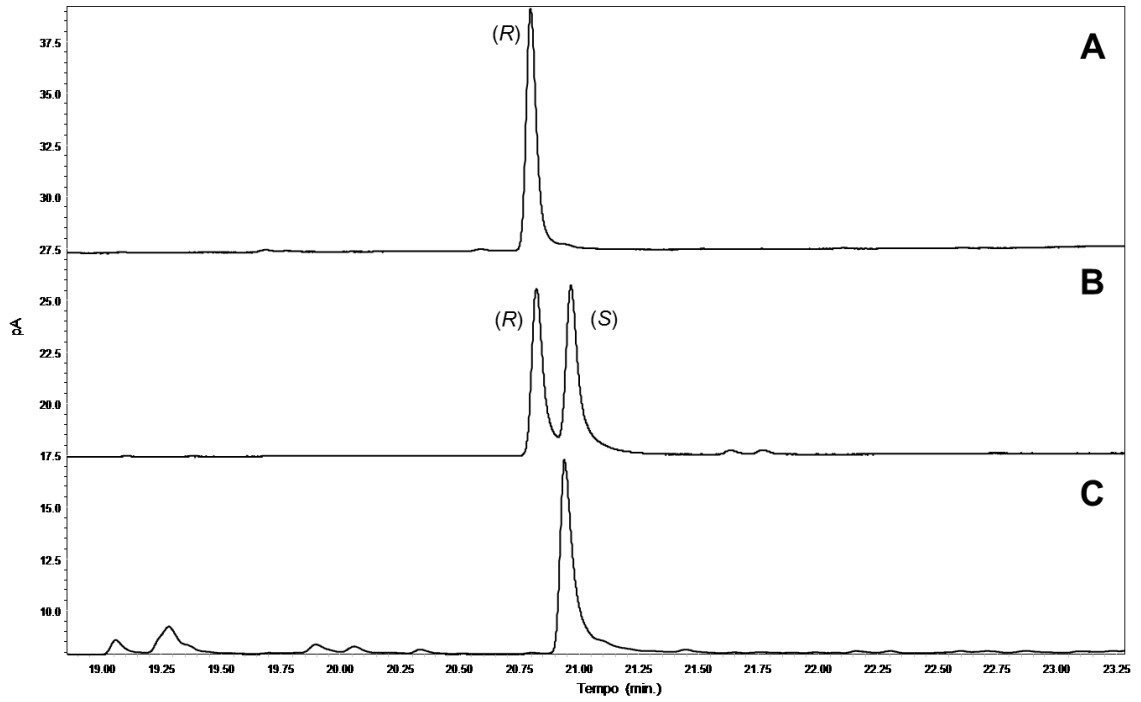
MARQUES, F. A.; MCELFRISH, J. S., MILLAR, J. G. Kováts retention indexes of monounsaturated C12, C14, and C16 alcohols, acetates and aldehydes commonly found in lepidopteran pheromone blends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.11, p.592-599, 2000.

PHEROBASE. Kovats Retention Index of Organic Compounds. 2011. Disponível em: <http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-index.php>. Acesso em: 26 Dez. 2013.

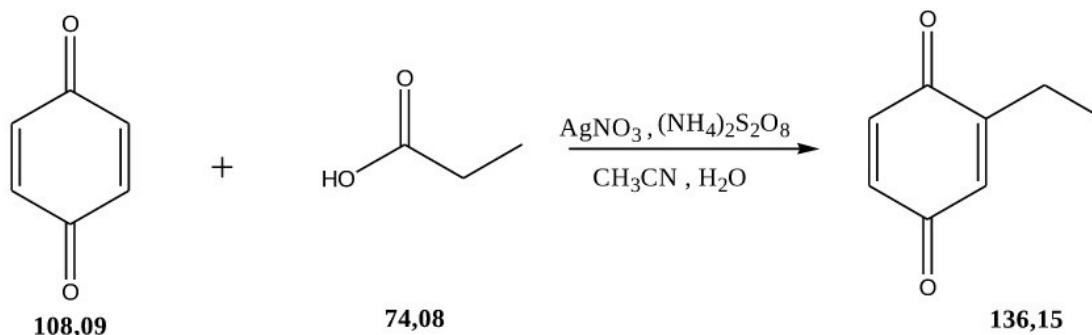
APÊNDICE 2. Cromatogramas dos padrões autênticos de A) (*R*)-limoneno, B) (*S*)-limoneno, C) extrato de aeração de machos, extratos de glândulas D) fêmeas e E) machos de *Alphitobius diaperinus*.



APÊNDICE 3. Cromatogramas dos padrões autênticos de A) (*R*)-linalol, B) (*R,S*)-linalol e C) extrato de aeração de machos de *Alphitobius diaperinus*.



APÊNDICE 4. Síntese do composto 2-etil-1,4-benzoquinona a partir da 1,4-benzoquinona



- 1,4-benzoquinona: 228,8 mg, 2,12 mmol
- Ácido propanóico: 222,3 mg, 3mmol.
- CH₃CN: 4 mL
- H₂O: 4 mL.
- AgNO₃: 70,3 mg, 0,2 eq.
- (NH₄)₂S₂O₈, 684,6 mg

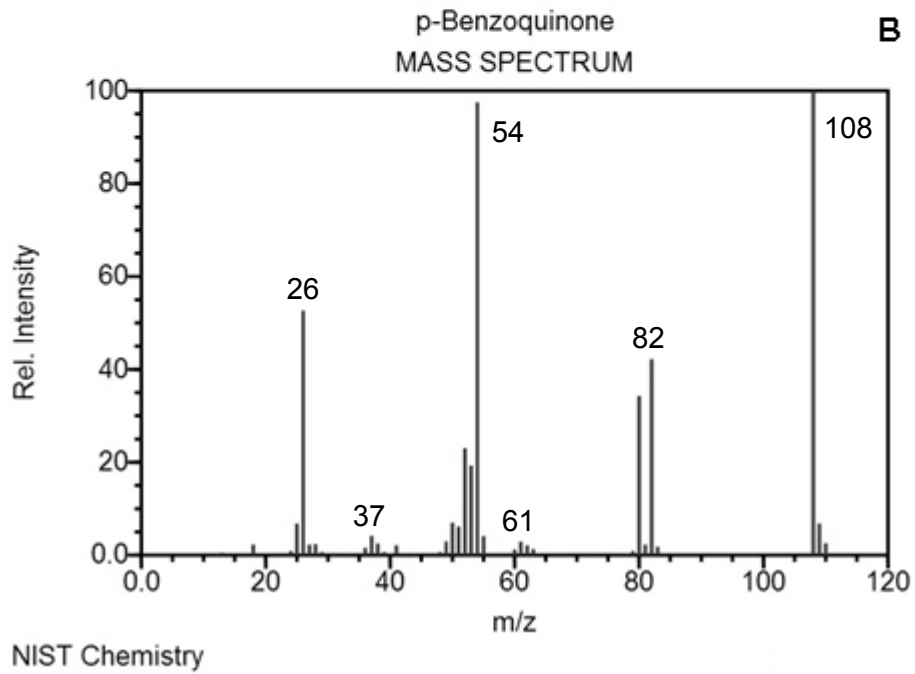
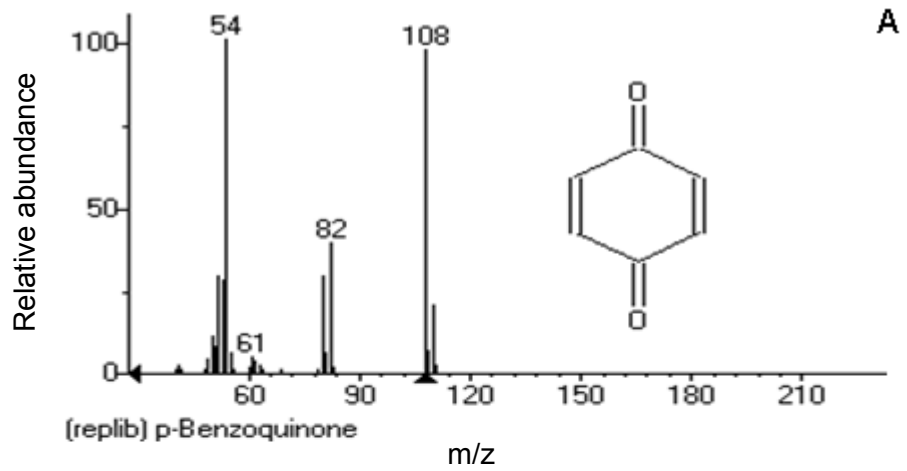
A uma mistura de 1,4-benzoquinona e ácido propanóico em acetonitrila e água, foram adicionados nitrato de prata e persulfato de amônio a temperatura ambiente. Após ser aquecida a 70°C por 5 horas, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente. O solvente foi evaporado à vácuo. O resíduo foi diluído em acetato de etila e lavado com água destilada e bicarbonato de sódio, sucessivamente. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, filtrada e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo foi separado em coluna de sílica.

APÊNDICE 5. Extração do carotol de sementes de cenoura para síntese do (*R*)-dauceno.

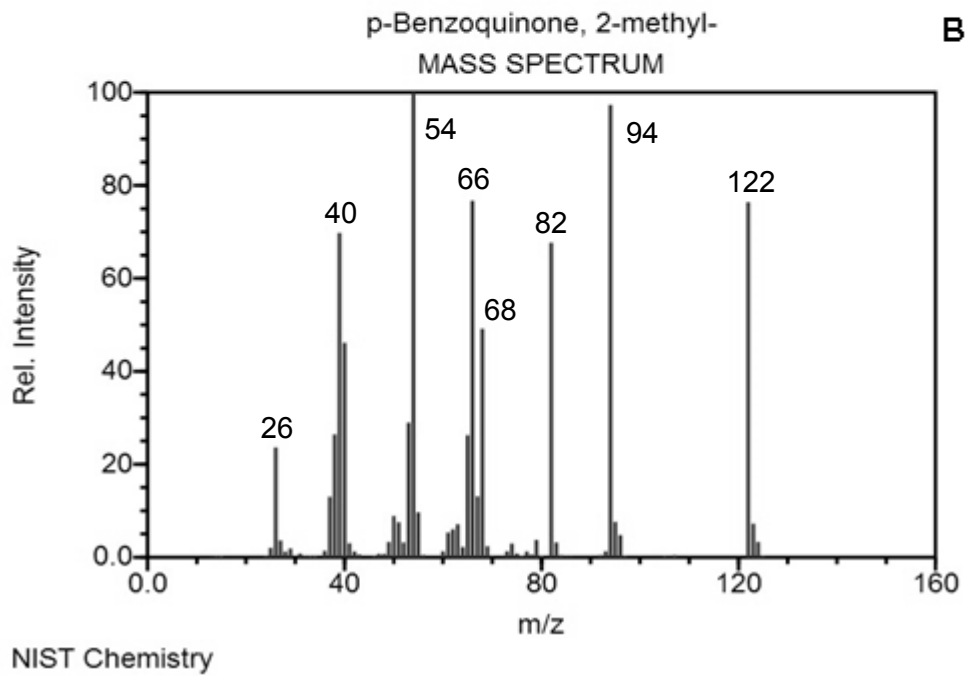
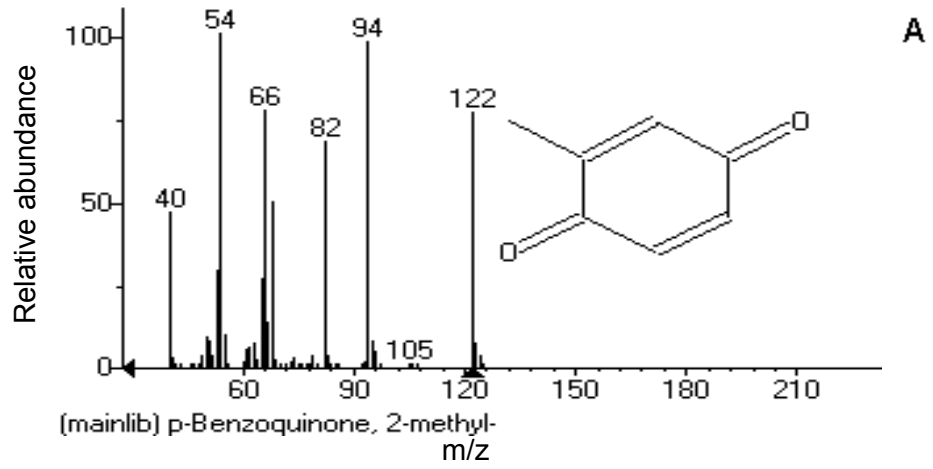
1. Sementes de cenoura da variedade Brasília, 15,6 gramas foram colocadas em um Erlenmeyer e cobertas com hexano bidestilado e deixadas por 8 horas a temperatura ambiente para extração.
2. Em seguida, foi feita uma extração líquido-líquido para separar antocianinas. Foram feitas extrações sequenciais em meio aquoso até não ter mais antocianinas, pigmento cor de rosa, isto é, até a água da extração estar transparente. O extrato orgânico obtido foi evaporado em evaporador rotativo e o obteve-se 571,5 mg de óleo amarelo bem claro. Deste óleo, 250 mg foram redissolvidos em hexano e fracionado em coluna de sílica gel impregnada com 10% de prata (15 g). O fracionamento foi conduzido com hexano 100%, seguido de lavagens com hexano: éter 2%. O carotol eluiu na quarta fração de 2% de éter (30 mL). O fracionamento foi acompanhado com placa de TLC e por análise de cromatografia gasosa. Obteve-se um óleo contendo carotol com uma pureza de 98%.
3. Para a síntese do (*R*)-Dauceno seguiu-se o procedimento de Levisalles & Rudler (1967). A análise por espectrometria de massas e cromatografia gasosa mostraram que o carotol foi todo consumido e formou o (*R*)-Dauceno com 87% de pureza, o extrato também continha outros sesquiterpenos que foram formados durante a reação.

Levisalles J & Rudler H. Terpénoides. II Carotol. I: Stéreoquímico do carotol. **Bulletin de la société chimique de France**. v. 365, p. 2059-2066, 1967.

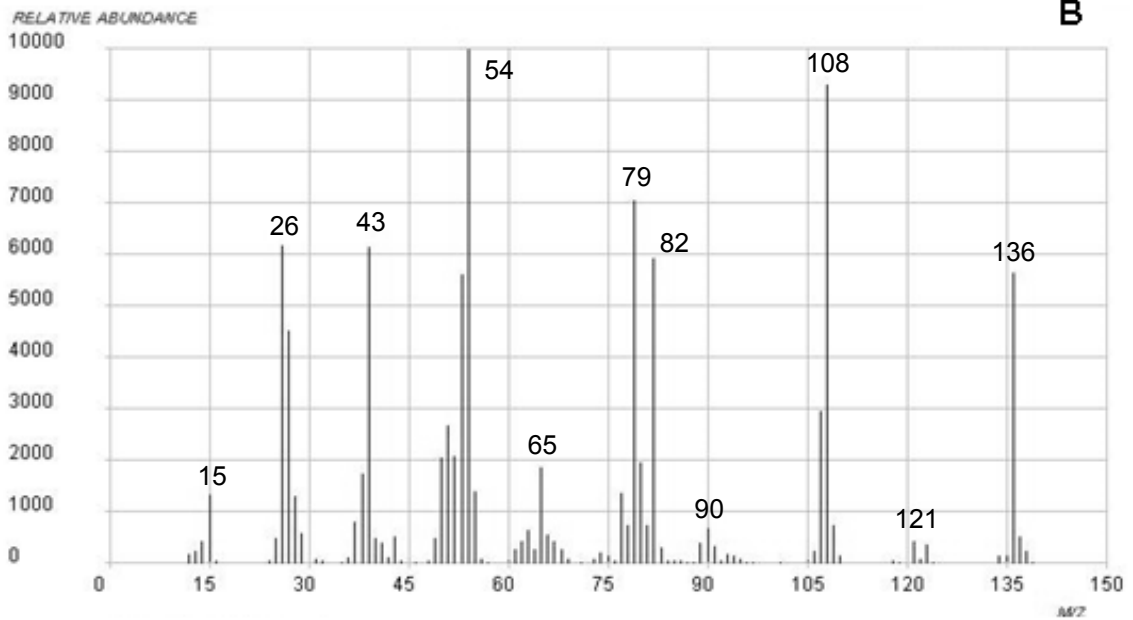
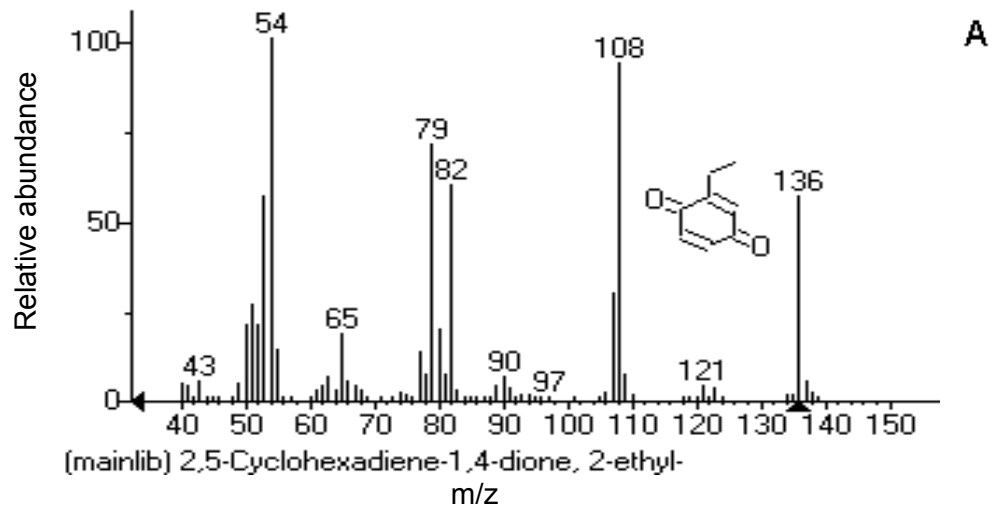
APÊNDICE 6. Espectro de massas de 1,4-benzoquinona dos extratos das glândulas de *Alphitobius diaperinus* (A) e padrão de compostos da biblioteca de espectro de massas (B).



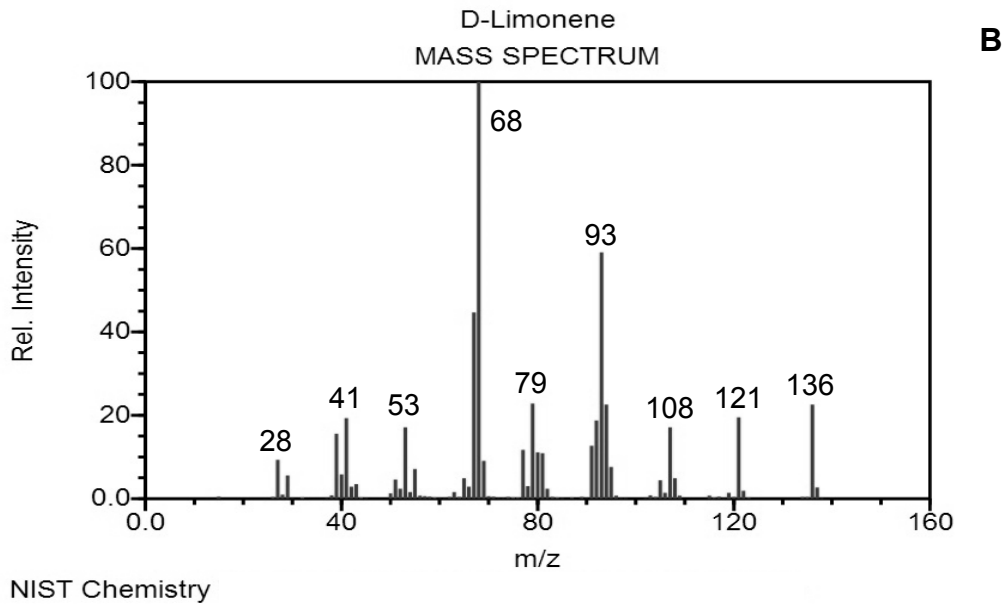
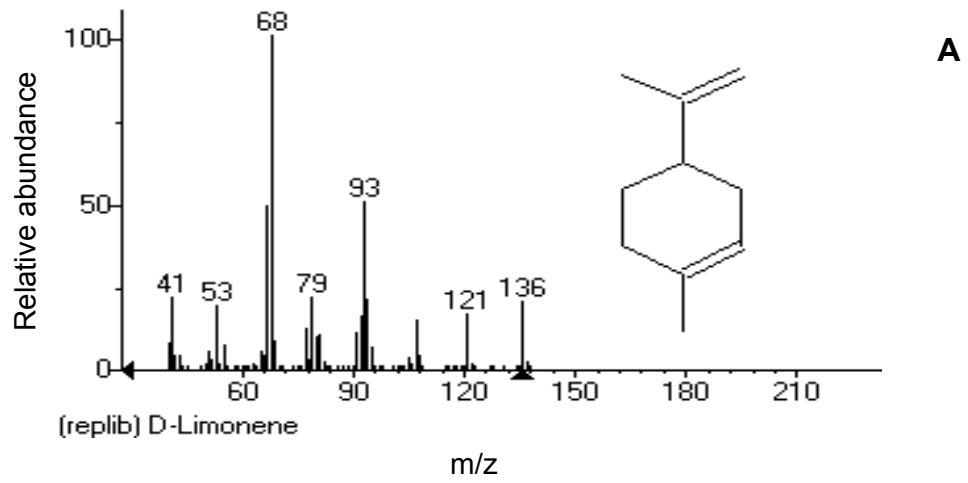
APÊNDICE 7. Espectro de massas de 2-metil-1,4-benzoquinona dos extratos das glândulas de *Alphitobius diaperinus* (A) e padrão de compostos da biblioteca de espectro de massas (B).



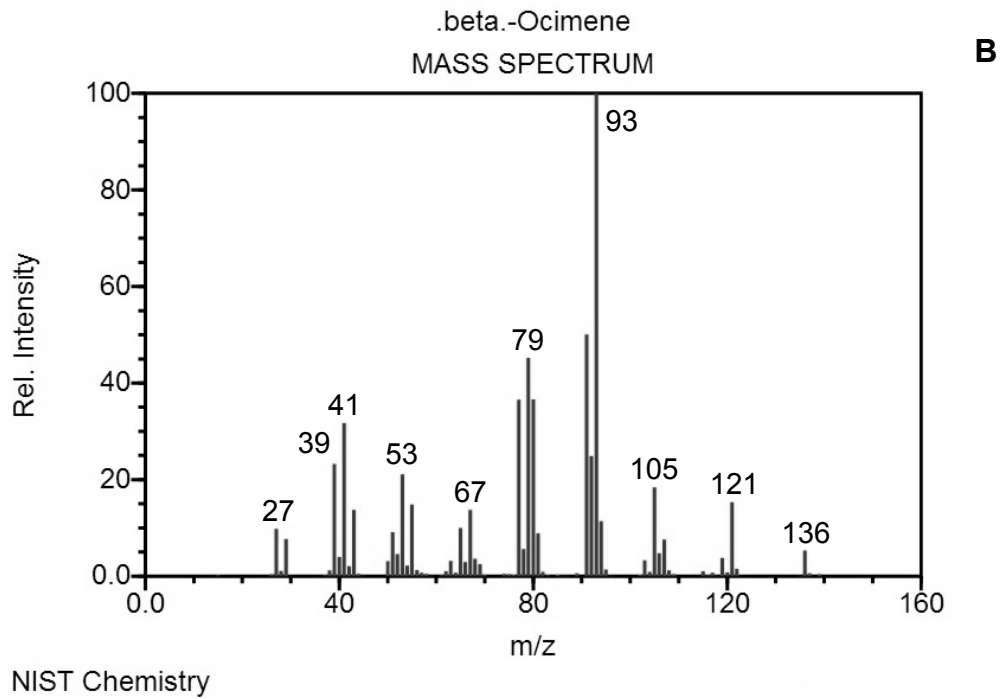
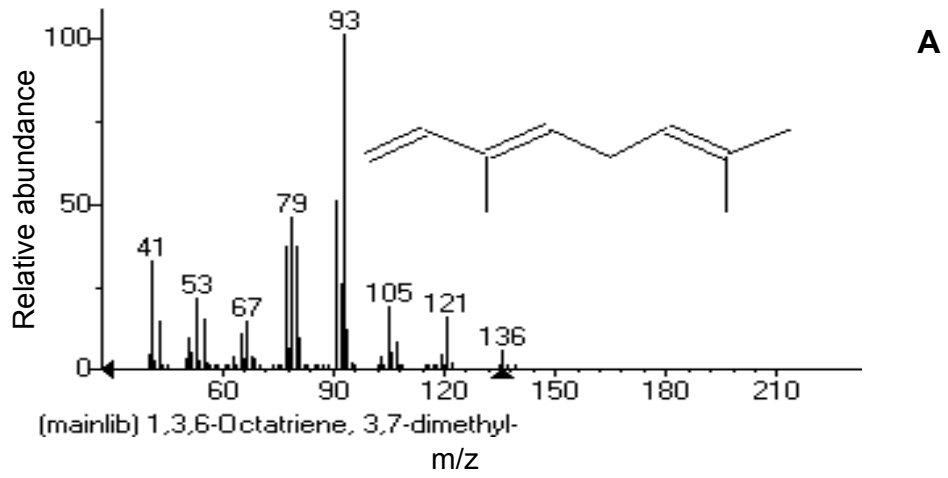
APÊNDICE 8. Espectro de massas de 2-etil-1,4-benzoquinona dos extratos das glândulas de *Alphitobius diaperinus* (A) e padrão de compostos da biblioteca de espectro de massas (B).



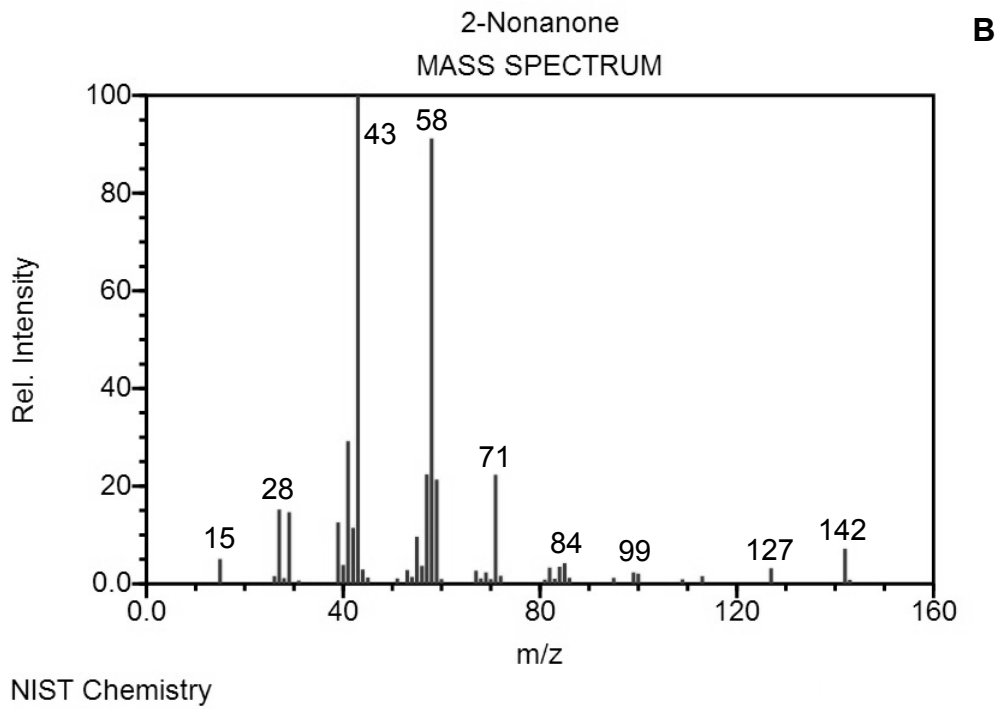
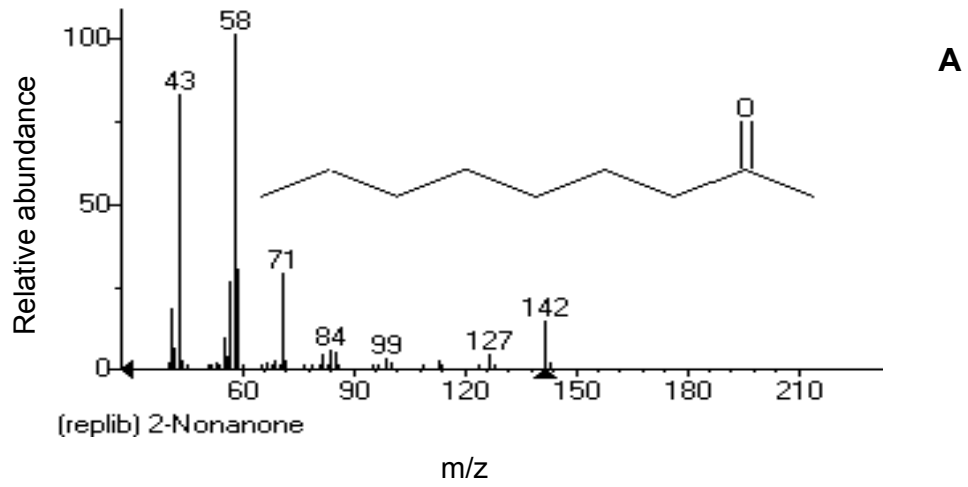
APÊNDICE 9. Espectro de massas de (*R*)-limoneno do extrato de machos de *Alphitobius diaperinus* (A) e padrão de compostos da biblioteca de espectro de massas (B).



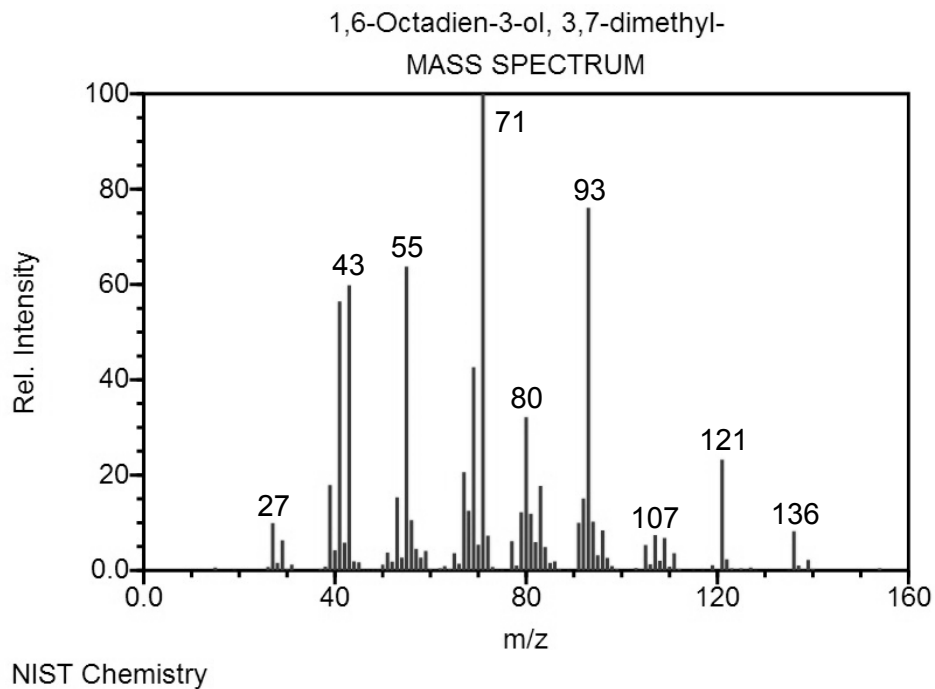
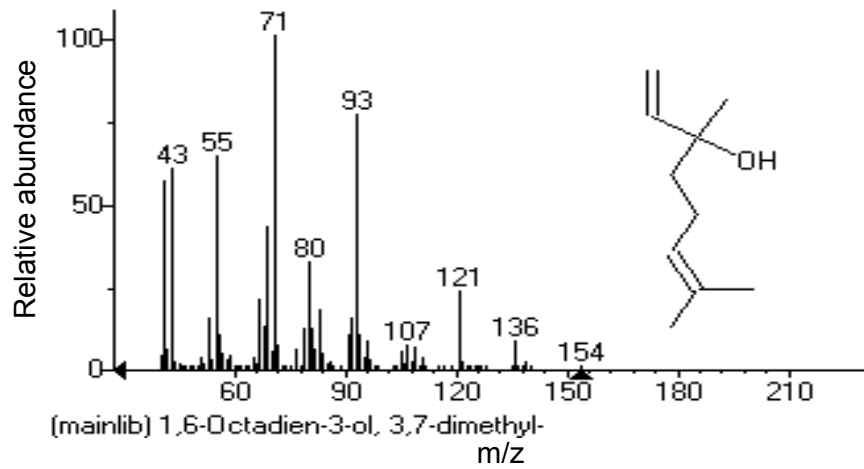
APÊNDICE 10. Espectro de massas de (*E*)- β -ocimeno do extrato de machos de *Alphitobius diaperinus* (A) e padrão de compostos da biblioteca de espectro de massas (B).



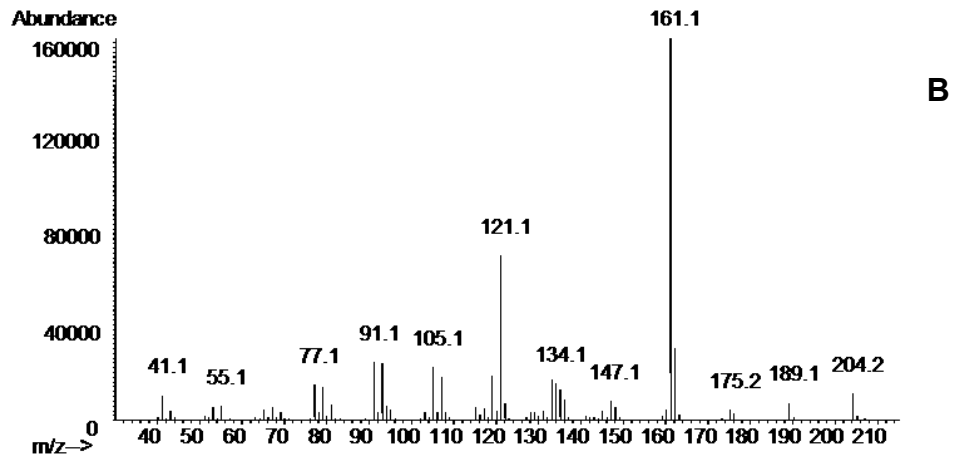
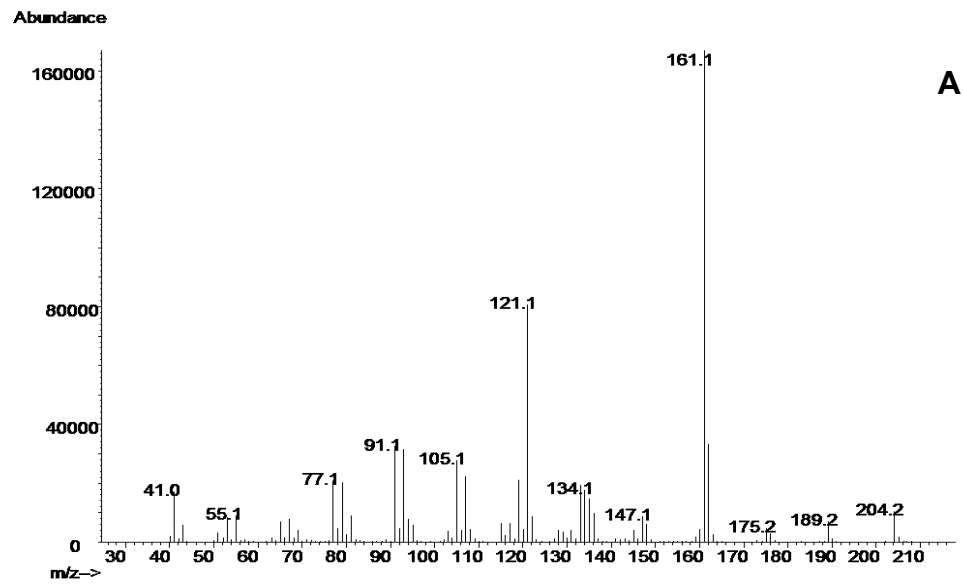
APÊNDICE 11. Espectro de massas de 2-nonanona do extrato de machos de *Alphitobius diaperinus* (A) e padrão de compostos da biblioteca de espectro de massas (B).



APÊNDICE 12. Espectro de massas de (S)-linalol do extrato de machos de *Alphitobius diaperinus* (A) e padrão de compostos da biblioteca de espectro de massas (B).



APÊNDICE 13. Espectro de massas de (*R*)-dauceno do extrato de machos de *Alphitobius diaperinus* (A) e padrão sintetizado (B).



APÊNDICE 14. Espectro de massas de (*E,E*)- α -farneseno do extrato de machos de *Alphitobius diaperinus* (A) e padrão de compostos da biblioteca de espectro de massas (B).

