

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Isolamento, identificação, síntese e avaliação de campo do feromônio sexual do minador-dos-citros, *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera: Gracillariidae)**

**Ana Lia Parra-Pedrazzoli**

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Entomologia.**

**Piracicaba  
2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ana Lia Parra-Pedrazzoli  
**Engenheiro Agrônomo**

**Isolamento, identificação, síntese e avaliação de campo do feromônio sexual do  
minador-dos-citros, *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera:  
Gracillariidae)**

**Orientador:**

**Prof. Dr. EVALDO FERREIRA VILELA**

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor  
em Ciências, Área de concentração: Entomologia.**

**Piracicaba  
2006**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Parra-Pedrazzoli, Ana Lia

Isolamento, identificação, síntese e avaliação de campo do feromônio sexual do minador-dos-citros, *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera: Gracillariidae) / Ana Lia Parra-Pedrazzoli. - - Piracicaba, 2006.

81 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.  
Bibliografia.

1. Biologia (classificação) 2. Feromônio sexual 3. Lagarta-minadora-dos-citros  
4. Manejo integrado 5. Planta hospedeira 6. Praga de planta I. Título

CDD 632.781

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

A Deus, acima de tudo

*Agradeço*

Aos meus queridos pais José Roberto e  
Lúcia e a minha querida irmã Raquel pelo carinho,  
amor e dedicação

*Dedico*

Ao meu marido Danilo pelo amor, incentivo e ajuda

*Ofereço*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Evaldo Ferreira Vilela, pela orientação, incentivo, confiança, apoio e amizade;

Ao Prof. Dr. José Maurício Simões Bento pelos valiosos ensinamentos, pela paciência, dedicação e amizade;

Ao Prof. Dr. Walter Soares Leal pela co-orientação e disponibilização do laboratório “Maeda-Duffey” e calorosa acolhida em Davis;

Aos colegas do laboratório “Maeda-Duffey”, Yuko Ishida, Angela Chen, Tania Morgan, Jessie pelo agradável convívio e ajuda;

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique G. Zarkin pelas valiosas sugestões na finalização do trabalho;

Aos professores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola pelos ensinamentos;

À Dra. Marinéia Lara Haddad pela realização das análises estatísticas e pelo agradável convívio;

A todos os amigos do Laboratório de Biologia dos Insetos: Neide, Peter, Negri, Maurício, Dori, Sandra, Adriana, Priscila, Ademir, Patrícia, Karina, Mariuxi (Maruzinha), Gilberto, José Francisco, Tatiana, Eliane, Marjorie, Nívia, Cristiane, Daniel, André (bakalhau), André (Sinhá), Danilo, Flávia, Nancy, Ohana, Alberto, Zé Wilson, Clarissa, Marina e Fernanda pela amizade, pelos momentos de alegria e descontração e grande ajuda;

Aos funcionários de campo do setor de Entomologia, em especial ao Carlinhos, Tutu e Dino;

À D. Ilda, “seu” Oswaldo, Luciana, Élio e Letícia, pelo carinho, preocupação, apoio e especialmente pelos momentos de alegria;

Aos funcionários do Departamento, especialmente Ana Gabriela e Marta;

Às bibliotecárias Eliana M. G. Sabino e Sílvia Zinsly pelo apoio e correção das referências bibliográficas;

Ao FUNDECITRUS pelo suporte financeiro e apoio logístico;

Ao Grupo FISCHER S/A AGROPECUÁRIA, pela concessão da área experimental;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante a realização do Curso de Pós-Graduação no Brasil;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos durante o período que estive nos EUA; (doutorado sanduíche).

## SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 DESENVOLVIMENTO.....	10
2.1 Revisão Bibliográfica.....	10
2.1.1 Distribuição geográfica e plantas hospedeiras de <i>P. citrella</i> .....	10
2.1.2. Danos e importância econômica.....	12
2.1.3 Biologia e comportamento.....	13
2.1.4 Controle de <i>P. citrella</i> em pomares cítricos.....	15
2.1.4.1 Controle biológico.....	15
2.1.4.2 Controle químico.....	17
2.1.4.3 Controle cultural.....	18
2.1.4.4 Controle mediado por semioquímicos.....	19
2.1.5 Feromônio sexual de insetos e sua utilização.....	19
2.1.6 Feromônio sexual de <i>P. citrella</i> .....	22
2.1.7 Procedimentos utilizados para a extração, isolamento e identificação de feromônio de insetos.....	23
2.1.7.1 Coleta de material.....	24
2.1.7.2 Concentração dos extratos.....	27
2.1.7.3 Análises iniciais.....	28
2.1.7.4 Cromatografia gasosa acoplada a um detector eletroantenográfico (GC- EAD) .....	28
2.1.7.5 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) .....	34
2.1.7.6 Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia no infra-vermelho (GC- FTIR) .....	36
2.1.7.7 Purificação.....	37
2.1.7.8 Micro-derivatizações.....	38
2.2 Material e métodos.....	39

2.2.1 Criação de manutenção dos insetos.....	39
2.2.2 Individualização das pupas de <i>P. citrella</i> para a obtenção de insetos virgens.....	40
2.2.3 Extração, isolamento e purificação do feromônio sexual de <i>P. citrella</i> .....	41
2.2.4 Identificação e síntese do feromônio sexual de <i>P. citrella</i> .....	43
2.2.4.1 Eletrofisiologia.....	43
2.2.4.2. Outros procedimentos Analíticos.....	44
2.2.4.3. Síntese do (Z,Z)-7,11-Hexadecadienal.....	44
2.2.4.4 Síntese do (Z,Z,E)-7,11,13-Hexadecatrienal.....	46
2.2.5 Formulação e Avaliação de Campo.....	48
2.3 Resultados e discussão.....	51
2.3.1 Identificação e síntese do feromônio sexual de <i>P. citrella</i> .....	51
2.3.2 Formulação e Avaliação de Campo.....	54
3 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS.....	67



## RESUMO

### **Isolamento, identificação, síntese e avaliação de campo do feromônio sexual do minador-dos-citros, *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera: Gracillariidae)**

Objetivou-se neste trabalho isolar, identificar e sintetizar o feromônio sexual de *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera: Gracillariidae), bem como avaliar a sua eficiência em condições de campo, visando a racionalização de controle desta praga dentro de um contexto de Manejo Integrado das Pragas de citros. A pesquisa foi desenvolvida parte no Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Piracicaba, da Universidade de São Paulo (USP), parte no Laboratório de Ecologia Química “Maeda-Duffey” do Departamento de Entomologia da Universidade da Califórnia (Davis-EUA) e parte no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA, Peoria, EUA). Diariamente, glândulas de feromônio de um grupo de 200 fêmeas com dois dias de idade, foram extraídas em um intervalo de no máximo duas horas, iniciando uma hora antes da fotofase. As extremidades dos abdômens foram imersas em solvente hexano por cerca de 1 h. Foram acumulados 5.000 equivalentes-fêmea e este extrato natural foi transferido para ampolas de vidro, as quais foram seladas e enviadas para Davis, EUA (Universidade da Califórnia). Usando a antena do macho como detector biológico, três picos ativos no detector eletroantegráfico (EAD) foram identificados a partir do extrato natural das glândulas de feromônio do minador-dos-citros, *P. citrella*. Baseando-se nos dados do cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa (GC-MS) e cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de infra-vermelho (GC-IR), os semioquímicos foram identificados como um novo feromônio, (Z,Z,E)-7,11-13-hexadecatrienal (trieno), um atraente previamente identificado, (Z,Z)-7,11-hexadecadienal (dieno) e (Z)-7-hexadecenal (monoeno) na proporção de 30:10:1, respectivamente. A identificação foi confirmada com os compostos sintéticos, os quais apresentaram tempos de retenção idênticos àqueles dos produtos naturais em três colunas capilares com fases polares e não polares. Em condições de campo, as armadilhas contendo o feromônio sintético, capturaram significativamente mais machos do que aquelas contendo fêmeas virgens. Os tratamentos com 2 (trieno+dieno, 3:1) e 3 compostos (trieno + dieno + monoeno, 30:10:1), nas concentrações alta (500 µg) e baixa (50 µg), não diferiram significativamente quanto a captura. Assim, comprovou-se que Z7Z11E13-16Ald e Z7Z11-16Ald são os constituintes essenciais do feromônio de *P. citrella* e poderão ser utilizados em pomares de citros para monitorar esta praga, tornando o seu controle mais econômico e efetivo, racionalizando as pulverizações e preservando os inimigos naturais no agroecossistema.

Palavras-chave: (Z,Z,E)-7,11,13-hexadecatrienal, (Z,Z)-7,11-hexadecadienal, (Z)-7-hexadecenal, Z7Z11E13-16Ald, Z7Z11-16Ald, Z7-16Ald, feromônio sexual, minador-dos-citros.

**ABSTRACT****Isolation, identification, synthesis and field evaluation of the sex pheromone from the citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera: Gracillariidae)**

The objectives of this work were to isolate, identify, and synthesize the sex pheromone of *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera: Gracillariidae), as well as to evaluate its efficiency in field conditions, to rationalize the control of this pest within a Citrus Integrated Pest Management scope. The research was developed at the Insect of Biology Laboratory, of the Department of Entomology, Plant Pathology and Agricultural Zoology of the Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Piracicaba, University of Sao Paulo (USP), at Maeda-Duffey Laboratory, of the Department of Entomology of the University of California, Davis (UCD-USA), and at the United States Department of Agriculture, (USDA, Peoria, USA). Pheromone glands from groups of 200 two-day-old virgin females were excised within 2 h, starting 1 h before the photophase. The abdominal tips were immersed in hexane for ca. 1 h. A total of 5,000 glands-equivalent was pooled, the extract was transferred to glass ampoules, which were sealed, and shipped to Davis. Using male antenna as the sensing element, three EAD-active peaks were identified from gland extracts of *P. citrella*. Based on GC-MS and GC-IR data, the semiochemicals were identified as a novel pheromone, (Z,Z,E)-7,11-13-hexadecatrienal, a previously identified attractant, (Z,Z)-7,11-hexadecadienal, and (Z)-7-hexadecenal in a ratio of 30:10:1, respectively. Identification was confirmed with synthetic compounds, which gave retention times identical to those of the natural products in three capillary columns with polar and non-polar phases. In field conditions, traps baited with the synthetic sex pheromone, attracted significantly more males than traps baited with virgin females. Binary and tertiary mixture with the major constituents in high and low concentrations did not differ significantly in the captures. Thus, it was confirmed that Z7Z11E13-16Ald e Z7Z11-16Ald are the essential constituents of the sex pheromone of *P. citrella* and they can be used on citrus crops for monitoring this pest, rationalizing and improving its control and maintaining the natural enemies in the environment.

**Key Words:** (Z,Z,E)-7,11,13-hexadecatrienal, (Z,Z)-7,11-hexadecadienal, (Z)-7-hexadecenal, Z7Z11E13-16Ald, Z7Z11-16Ald, Z7-16Ald, sex pheromone, citrus leafminer.

## 1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira destaca-se pela alta tecnologia empregada no manejo dos pomares, sendo que os aspectos fitossanitários vêm merecendo grande atenção nos últimos anos. As pragas e doenças exóticas introduzidas recentemente em nosso país têm ocasionado enormes perdas e preocupações aos profissionais ligados a este setor. O minador-dos-citros, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera, Gracilariidae), é uma praga originária da Ásia e atualmente, encontra-se distribuída nos cinco continentes (ARGOV; RÖSSLER, 1996; HEPPNER, 1993; PRATES; NAKANO; GRAVENA, 1996). No Brasil, foi registrado pela primeira vez em pomares da variedade Valência, em Iracemápolis, região citrícola de Limeira, a partir da qual, em dois meses, se espalhou por todo o Estado de São Paulo (FEICHTENBERGER; RAGA, 1996), constituindo-se desde então, em mais uma séria praga associada aos citros.

O adulto do minador-dos-citros é um microlepidóptero e a oviposição é realizada em folhas novas (brotações) de citros e as lagartas, ao eclodirem, penetram no mesófilo foliar, provocando minas (galerias) típicas em forma de serpentina. Estas lesões promovem a atrofia do tecido foliar, o qual assume uma coloração prateada surgindo, posteriormente, manchas necróticas, que levam ao secamento destas estruturas, prejudicando sensivelmente o desenvolvimento da planta. Além de comprometer a fotossíntese, os danos provocados pela praga, podem resultar na queda prematura das folhas e impedir o desenvolvimento das brotações, refletindo conseqüentemente na produção do pomar (BADAWY, 1967; CLAUSEN, 1931; HEPPNER, 1993; PRATES; NAKANO; GRAVENA, 1996).

Embora os adultos de *P. citrella* não sejam vetores eficientes da bactéria causadora do cancro cítrico, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (BELASQUE et al., 2005), as fases imaturas (lagartas) por meio da alimentação, favorecem a entrada desta bactéria nos tecidos vegetais, causando o cancro cítrico. Esta doença é conhecida mundialmente como "Asiatic Citrus Canker" e apresenta um potencial devastador de algumas espécies de citros, especialmente aquelas cultivadas em áreas onde são registradas, simultaneamente, chuva em abundância e temperaturas elevadas (PRUVOST et al., 1997).

Levantamentos realizados pelo FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura) têm demonstrado um quadro preocupante desde o registro do minador no Brasil, uma vez que o número de focos de cancro cítrico no Estado de São Paulo, aumentou de 45 em 1996 (ano da constatação da praga no país) para 4.180 focos em 1999 (FUNDECITRUS, 2005).

Embora o minador-dos-citros apresente um grande número de inimigos naturais, e o parasitóide exótico *Ageniaspis citricola* Logvinovskaya (Hymenoptera: Encyrtidae), tenha sido introduzido e se adaptado satisfatoriamente em diversas regiões paulistas (CHAGAS et al., 2002; PARRA et al., 2001; PARRA et al., 2004), a supressão de suas populações têm sido realizada predominantemente por meio do controle químico. O uso de inseticidas não seletivos e de forma indiscriminada, além de causar desequilíbrios pela eliminação dos inimigos naturais, com freqüentes explosões populacionais da praga, pode selecionar linhagens resistentes da mesma.

Um sistema de detecção dos adultos por meio de armadilhas contendo feromônio sexual sintético poderá ser um importante instrumento para prever a ocorrência da praga e tornar o seu controle mais econômico e efetivo, racionalizando as pulverizações e preservando os inimigos naturais no agroecossistema. Do mesmo modo, técnicas de coleta massal, confundimento e atrai-mata poderão, eventualmente, serem utilizadas no controle desta praga, se for conhecido o seu feromônio sexual.

Assim, esta pesquisa teve por objetivo o isolamento, a identificação e a síntese do feromônio sexual de *P. citrella*, bem como a avaliação da sua eficiência no campo, visando a racionalização de controle desta praga dentro de um contexto de Manejo Integrado das Pragas de citros.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Revisão Bibliográfica**

#### **2.1.1 Distribuição geográfica e plantas hospedeiras de *P. citrella***

O adulto do minador-dos-citros, *Phyllocnistis citrella* é um microlepidóptero de 4 mm de envergadura e 2 mm de comprimento; as asas anteriores apresentam escamas de coloração branca-prateada, mescladas com pequenas manchas de coloração marrom-amarelada e preta, destacando-se uma mancha preta de tamanho maior na porção apical das asas, característico da espécie (CHIARADIA; MILANEZ, 1997; GARIJO; GARCIA, 1994; HEPPNER, 1993; SMITH; HOY, 1995).

*P. citrella* teve sua origem detectada na Ásia, sendo coletada pela primeira vez em Calcutá (Índia). A sua ocorrência era restrita ao Velho Mundo, até Heppner (1993) registrá-lo no continente americano, em pomares de citros do sul da Flórida, nos EUA. A partir daí, essa praga dispersou-se para várias regiões produtoras de citros dos EUA, constituindo-se em mais uma praga de importância econômica, especialmente, quando infesta plantios novos em pleno desenvolvimento vegetativo.

Atualmente, encontra-se distribuído nos 5 continentes, sendo mencionado em 54 países, dos quais 25 asiáticos, 9 africanos, 6 da Oceania, 3 europeus e 11 americanos (ARGOV; RÖSSLER, 1996; HEPPNER, 1993; PRATES; NAKANO; GRAVENA, 1996).

No Brasil, a partir da sua constatação no Estado de São Paulo, em 1996, na região de Limeira, observou-se uma rápida dispersão para outras áreas produtoras de citros de vários estados brasileiros, entre os quais, Amazonas, Roraima, Rondônia, Piauí, Bahia, Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Paraná (CHIARADIA; MILANEZ, 1997; DIDONET; AGUIAR; PANATO, 1998; NASCIMENTO; VIDAL, 1998).

Quarentenas e outras barreiras, aparentemente, têm sido pouco eficientes na restrição da dispersão desta praga. De acordo com Hoy e Nguyen (1997) isto se deve, provavelmente, a dois fatores: alta taxa de reprodução com múltiplas gerações/ano e facilidade de dispersão, por transporte de plantas infestadas, feito pelo homem.

Os principais hospedeiros do minador-dos-citros são as espécies de citros e rutáceas afins (GRAVENA, 1996; LORENÇÃO; MÜLLER, 1994). A família Rutaceae representa mais de 80% das espécies hospedeiras desse inseto, embora, *P. citrella* também ocorra em hospedeiros alternativos pertencentes às famílias Oleaceae, Laranthaceae, Leguminosaceae e Lauraceae (HEPPNER, 1993; PRATES; NAKANO;

GRAVENA, 1996). Nos EUA (Flórida) e na Ásia, o minador-dos-citros foi encontrado em ornamentais como severins, jasmine e murraia (KNAPP et al., 1995).

### 2.1.2. Danos e importância econômica

As fêmeas de *P. citrella* ovipositam em folhas novas (brotações) de plantas cítricas; as lagartas ao eclodirem, penetram no mesofilo foliar e iniciam a alimentação formando uma galeria, inicialmente paralela à nervura central e depois bastante sinuosa, em forma de serpentina, sendo que a epiderme foliar atacada assume coloração prateada. Este tipo de dano afeta a fotossíntese, por meio da redução da área foliar. Em altas populações (mais de 4 minas/folha), a lagarta provoca a interrupção do desenvolvimento das folhas jovens, inibindo a sua abertura e expansão, deformando-as completamente e podendo causar a sua queda (PEÑA & DUNCAN, 1993).

Há registros do ataque dessa praga em frutos (HEPPNER, 1995), bem como em pecíolos das brotações, especialmente em variedades que apresentam ramos mais tenros (HUTSON; PINTO, 1934). Os danos causados à planta dependem do nível de infestação do minador-dos-citros. Em altas infestações desta praga, o potencial produtivo do pomar é reduzido (HEPPNER, 1993; HUANG; LI, 1989; PRATES; NAKANO; GRAVENA, 1996).

As minas abertas pelas lagartas de *P. citrella* favorecem, não somente a entrada de microorganismos oportunistas, mas principalmente a bactéria do cancro cítrico, *X. axonopodis* pv *citri*, a qual infecta as folhas novas de plantas cítricas, penetrando através da abertura dos estômatos, ferimentos foliares provocados pelo homem e, nos tecidos previamente danificados por esse inseto.

Chagas et al. (2001) constataram que embora a bactéria *X. axonopodis* pv *citri* possa penetrar através dos estômatos, a taxa de infecção em folhas lesionadas pelo minador é 11 vezes maior do que em folhas intactas (sadias); entretanto, não foi observada a disseminação desta bactéria por adultos de *P. citrella* naquele trabalho e em trabalhos posteriores (BELASQUE et al, 2005).

Por este motivo, desde a constatação do minador-dos-citros, *P. citrella*, no Brasil (PRATES; NAKANO; GRAVENA, 1996), tem havido uma grande preocupação dos citricultores, não somente com os danos diretos causados pelo inseto às plantas (GRAVENA, 1994; LOURENÇÃO; MÜLLER; PRATES, 1994), mas, principalmente, com a possibilidade da associação das lesões causadas pelas lagartas, com a disseminação, em larga escala, da bactéria do cancro cítrico, *X. axonopodis* pv *citri*.

### 2.1.3 Biologia e comportamento

O dimorfismo sexual entre adultos não é evidente (JACAS; GARRIDO, 1996), dificultando as atividades rotineiras desenvolvidas por pesquisadores em estudos de laboratório. A separação dos sexos é normalmente feita na fase de pupa, sendo que as fêmeas apresentam o último segmento abdominal mais longo, devido à junção dos segmentos X e IX, além de apresentarem duas cerdas laterais; enquanto nos machos, esse segmento é mais curto e desprovido de cerdas (CLAUSEN, 1931; JACAS; GARRIDO, 1996). Nos adultos, a parte terminal do abdome das fêmeas apresenta duas faixas escuras de escamas que se estendem do sétimo ao nono segmento abdominal, podendo ser visualizadas lateralmente ao lóbulo do ovipositor, mediante observações em microscópio estereoscópico (JACAS; GARRIDO, 1996).

O minador-dos-citros prefere ovipositar na superfície abaxial e na nervura principal das folhas de citros, sendo tais ovos colocados em maior quantidade no terço apical e porção mediana da área foliar (CHAGAS; PARRA, 2000).

Os ovos desta praga são ligeiramente convexos, translúcidos, medindo 0,3 x 0,2 mm, sendo de difícil visualização a olho nu. Próximos à eclosão, tornam-se opacos e amarelados (ALBA, 1996; BATRA et al., 1988, GARIJO; GARCIA, 1994; HEPPNER, 1995).

As lagartas ao eclodirem, penetram no mesófilo foliar, iniciando a construção de minas, e, no interior da folha, completam o desenvolvimento larval. As minas geralmente se localizam na superfície abaxial da folha, podendo em altas infestações, ocorrerem em ambas as superfícies. Normalmente, apenas uma lagarta se desenvolve

por folha, embora em ataques intensos, já tenham sido verificadas de 9 a 20 minas/folha (HEPPNER, 1993; HUTSON; PINTO, 1934; PANDEY; PANDEY, 1964). Ao final do período larval, as lagartas confeccionam uma câmara pupal por meio da secreção de fios de seda, dobrando a margem ou mesmo a parte mediana da folha, local onde se transformam em pupas. Estas são obtectas, com formato alongado, de coloração marrom clara, com um processo pontiagudo na região anterior, utilizado provavelmente, para o rompimento da câmara pupal por ocasião da emergência dos adultos (HEPPNER, 1993).

Em condições climáticas desfavoráveis, principalmente no inverno de clima temperado, o minador-dos-citros, pode sobreviver, por meio da diapausa, nos estágios de pupa ou adulto (CLAUSEN, 1931).

A duração do período ovo-adulto de *P. citrella*, varia de 32,6 a 11,5 dias nas temperaturas de 18 e 32°C, respectivamente (CHAGAS; PARRA, 2000). Batra et al. (1988) observaram um intervalo bastante grande na duração do ciclo do minador-dos-citros, entre 54,5 e 14,4 dias, quando esse foi criado sob as condições médias de temperatura de 13,7 e 31,5°C, respectivamente.

Ba-Angood (1978) observou, sob condições controladas de temperatura ( $20 \pm 1,5$ ;  $25 \pm 1,0$ ;  $30 \pm 1,0$  e  $35 \pm 1,0^\circ\text{C}$ ), valores médios de 18,5; 15,6; 12,5; 10,4 e de 19,5; 16,6; 10,3 e 9,2 dias, para os respectivos períodos larval e pupal do minador. A relação inversa entre o aumento de temperatura na qual o inseto foi criado, e a duração dessas fases de desenvolvimento, foi ratificada por Batra et al. (1988), que constatou valores médios de 22,01 e 5,3; 22,9 e 5,9 dias para os períodos larval e pupal de *P. citrella*, quando criado nas temperaturas médias de 10,1 e 31,5 °C, respectivamente.

Além dos fatores abióticos, a fisiologia e/ou caracteres morfológicos das plantas e da espécie de citros na qual o inseto se desenvolve podem afetar a duração do ciclo (ovo-adulto) (BA-ANGOOD, 1977; BADAWEY, 1967; BATRA et al., 1988; GARIJO; GARCIA, 1994; HUANG et al., 1989b; SINGH, 1984; RADKE; KANDALKAR, 1987; WILSON, 1991).

Ba-Angood (1977) obteve, em laboratório, sob condições de temperatura não controlada, valores de longevidade para machos e fêmeas bastante discrepantes, em função da ocorrência ou não de acasalamento. Sem cópula, a longevidade média para



ambos os sexos foi de aproximadamente 6 dias, ao passo que aqueles acasalados, apresentaram longevidades menores, variando de 24 a 36 horas. Radke e Kandalkar (1987) e Huang et al. (1989b), relataram valores de longevidade variáveis de 1 a 7,5 e 1 a 22,5 dias, para machos e fêmeas desse inseto, respectivamente.

O número de gerações de *P. citrella* por ano pode variar de 5 a 14, dependendo das condições climáticas (CHAGAS; PARRA, 2000; CLAUSEN, 1931; HUANG et al. 1989a; PANDEY; PANDEY, 1964).

Machos e fêmeas emergem simultaneamente, com uma proporção macho:fêmea de 1:1 (PARRA; VILELA; BENTO, 2002).

Os adultos emergem ao amanhecer, e realizam suas atividades do crepúsculo ao amanhecer (ALBA, 1996; ARGOV; RÖSSLER, 1996; GARIJO; GARCIA, 1994; HEPPNER, 1993). A oviposição de *P. citrella* é realizada durante o crepúsculo (BADAWY, 1967; HEPPNER, 1993; PANDEY; PANDEY, 1964; PARRA; VILELA; BENTO, 2002). A cópula inicia-se dentro de um período máximo de 9 a 72 h após a emergência, com duração variável de 30 min até 9 h (BA-ANGOOD, 1977; BATRA et al., 1988; CLAUSEN, 1931; HUANG et al., 1989a; RADKE KANDALKAR, 1987; PANDEY; PANDEY, 1964; KNAPP et al., 1994).

Parra-Pedrazzoli et al. (2006) observaram que os acasalamentos de *P. citrella* ocorrem com casais de 1 e 2 dias de idade, logo ao amanhecer, com uma duração de cópula de 49,6 min. Jacas e Pena (2002) estudando o efeito da idade e fotoperíodo no comportamento de chamamento de *P. citrella*, observaram que estes são sexualmente ativos logo ao amanhecer e que o início do chamamento não foi afetado pela idade das mariposas, embora a proporção de fêmeas “chamando” tenha aumentado com a idade.

## **2.1.4 Controle de *P. citrella* em pomares cítricos**

### **2.1.4.1 Controle biológico**

Um número significativo de inimigos naturais é relatado na literatura, associado ao controle natural do minador-dos-citros, especialmente parasitóides da ordem Hymenoptera (HEPPNER, 1993). Existem evidências, em nível mundial, de que os

surtos de *P. citrella* podem ser reduzidos por meio da utilização de parasitóides como agentes de controle biológico. O Brasil possui uma fauna rica de parasitóides de insetos minadores; muitas espécies nativas têm sido encontradas parasitando o minador-dos-citros em altos níveis populacionais, mas sem serem suficientes para controlá-lo (PENTEADO-DIAS et al., 1997; SÁ et al., 1998).

O parasitismo natural é responsável por taxas significativas de mortalidade durante os estágios imaturos do minador, variando de 17 a 54,4% (CHEN; LE, 1986; UJIYE, 1988).

Os principais parasitóides com potencial de controle do minador-dos-citros são: *Ageniaspis citricola* Logvinovskaya; *Galeopsomyia fausta* Lasalle; *Cirrospilus ingennus* Gahan; *Elasmus* sp. e *Pnigalio* sp. (ARGOV; RÖSSLER, 1996, 1998; BROWNING; PEÑA, 1995; HEPPNER, 1993; PEÑA; DUNCAN; BROWNING, 1996; SMITH; HOY, 1995; SUBBA RAO; RAMAMANI, 1965).

No Brasil, o parasitóide nativo mais abundante é o microimenóptero *G. fausta* (PENTEADO-DIAS et al., 1997; NASCIMENTO; VIDAL, 1998; SÁ et al., 1998; SÁ et al., 1999).

Dentre essas espécies, *A. citricola* tem sido indicado como o agente de controle biológico mais eficiente na implementação de programas de controle biológico clássico desde a sua introdução na Austrália (NEALE et al., 1995), Israel (ARGOV; RÖSSLER, 1996), EUA (HOY et al., 1997) e Peru (SACARIAS; CANALES, 1999). No Brasil, *A. citricola* foi introduzido em 1998, com a primeira liberação no dia 28 de outubro deste mesmo ano. Sete anos após a sua introdução, se adaptou totalmente às diversas regiões citrícolas do Estado de São Paulo e hoje está ocupando o nicho de parasitóides nativos, reduzindo sensivelmente a população de *P. citrella* (PARRA et al., 2004). Em algumas regiões, por problemas climáticos, o parasitóide não se adaptou, como a região do Mediterrâneo. Segundo Parra et. Al (2004), no Brasil, após 7 anos da introdução de *A. citricola*. Além dos parasitóides, ainda existem vários predadores contribuindo para a redução das populações do minador-dos-citros, entre eles, formigas lava-pé, aranhas, larvas de crisopídeos, tripes, percevejos e vespas (BROWNING; PEÑA, 1995, GRAVENA, 1996).

Apesar do controle natural de *P. citrella*, por algumas espécies nativas, ser alto, o controle biológico, isoladamente, não é suficiente para manter a praga em equilíbrio, havendo necessidade de serem utilizados outros métodos de controle (CHEN; LE, 1986).

#### 2.1.4.2 Controle químico

Devido à grande importância dessa praga para a cultura dos citros, o controle químico tem predominado como medida de supressão da sua população (KNAPP et al., 1994). Com base em estudos realizados na Austrália, há recomendações de uso de dimetoato, diazinon e permetrina, entre outros, adicionados a óleo mineral.

Prates; Nakano e Gravena (1996) recomendaram a utilização de imidacloprid, abamectin e diflubenzuron aliados ao manejo da fertirrigação, a fim de controlar o período de brotação das plantas.

Raga et al. (1998) avaliando a ação de diversos ingredientes ativos em várias concentrações, registraram que os produtos tebufenozide, cartap, fipronil, carbaril e hexyiazox apresentam efeito de choque sobre *P. citrella*, reduzindo em mais de 80% o número de larvas, 6 dias após a aplicação. Imidacloprid, apresentou uma ação inicial mais lenta e alcançou níveis de redução de larvas de até 97,9% aos 14 e 28 dias após a aplicação.

Rodrigues et al. (1997) testaram nove inseticidas para o controle do minador-dos-citros em borbulheiras de laranja. Os tratamentos foram: água (testemunha), óleo mineral, ciflutrina, dimetoato, abamectin mais óleo mineral, diflubenzuron, imidacloprid mais óleo mineral, deltametrina e *Bacillus thuringiensis*. Todos os produtos e doses avaliadas proporcionaram redução na porcentagem de ramos atacados e no número de minas, sendo abamectin mais óleo mineral o mais efetivo na redução da praga, seguido de imidacloprid mais óleo mineral e diflubenzuron.

Macedo; Botelho e Rubim (1996) observaram maior eficiência do inseticida Vertimec 18 CE no controle do minador (95,6% de controle), seguido por Confidor 700 GrDA (90,5%) e Match 50 CE (90,4%).

Yamamoto; Roberto e Pria Jr. (2000) confirmaram a eficiência de acetamiprid SL e imidacloprid no controle de *P. citrella*.

Gravena et al. (2000) obtiveram média de infestação de 12,9% com o uso de imidacloprid, em aplicação sistêmica no tronco e 29,2% para pulverização foliar convencional.

A adoção do controle químico deve ser precedida do levantamento do nível de infestação da praga no pomar, sendo recomendada a pulverização quando o nível de controle for atingido. Para *P. citrella*, o nível de controle em pomares novos, é de 10% dos ramos com lagartas vivas de primeiro ou segundo ínstaes e em pomares adultos, é de 30% dos ramos com lagartas vivas de primeiro ou segundo ínstaes e quando o talhão apresentar 50% de plantas com brotações novas (GRAVENA, 1998). Entretanto, devido à dificuldade de serem realizadas as amostragens e devido à falta de conscientização dos produtores, o controle químico muitas vezes é realizado de forma preventiva.

#### **2.1.4.3 Controle cultural**

Knapp et al. (1995) sugerem como medida de controle cultural a poda de brotações, visando uniformizar os fluxos de crescimento, além da redução da fertirrigação e níveis de irrigação no verão e outono, quando ocorrem altas populações da praga. Entretanto, têm-se encontrado dificuldades em implantar essas medidas nas condições da Flórida, EUA, onde ocorrem grandes tempestades.

Batra; Sharma e Chanana (1992) constataram em estudos de campo na Índia, a resistência das variedades Carrizo, Sacaton, Savage, Troyer, Yama, Citrange, Citrumelo, Cambell Valência, Pomary, Rubidox e Murraya Koenigui ao minador. O porta enxerto Cleópatra apresentou-se como pouco suscetível.

O uso de variedades de citros resistentes ao ataque do minador por antibiose ou não preferência para oviposição tem sido preconizado por Wilson (1991).

#### **2.1.4.4 Controle mediado por semioquímicos**

Dentre os vários grupos de animais, os insetos provavelmente são os que mais dependem do olfato para desempenhar suas atividades comportamentais (BIRCH; HAYNES, 1982). A comunicação é parte integrante do comportamento, e diferentemente dos outros animais que utilizam amplamente a visão e audição, para os insetos, o sistema olfativo, por meio de sinais químicos, é a fonte primária de informação. Os odores são muito importantes na localização das presas, na defesa e na agressividade, na seleção de plantas, na escolha do local de oviposição, na corte e no acasalamento, na organização das atividades sociais e em diversos outros tipos de comportamento.

As substâncias químicas usadas na comunicação, em geral, são denominadas semioquímicos, o que significa “sinais químicos”, os quais podem ser aleloquímicos ou feromônios, dependendo da ação que provoquem. Os aleloquímicos são substâncias de ação interespecífica e os feromônios são substâncias químicas de ação intraespecífica.

#### **2.1.5 Feromônio sexual de insetos e sua utilização**

O termo feromônio pode ser definido como “substância secretada por um indivíduo para o exterior e recebida por um segundo indivíduo da mesma espécie provocando uma reação específica (comportamento definido) ou um processo de desenvolvimento fisiológico definido” (KARLSON; LÜSCHER, 1959). Os feromônios podem ser definidos, de forma mais abrangente, como infoquímicos mediadores de uma interação de organismos da mesma espécie (ação intraespecífica), produzindo uma resposta comportamental ou fisiológica adaptativamente favorável ao receptor, ao emissor ou a ambos os organismos na interação (VILELA; DELLA LUCIA, 2001).

Feromônios sexuais são mensageiros químicos produzidos por um sexo do inseto para atração do sexo oposto com propósito de reprodução. Estes compostos estão entre as substâncias fisiologicamente mais ativas hoje conhecidas, por causarem respostas quando usadas em concentrações extremamente baixas.

O maior número de espécies de insetos cujos feromônios têm sido estudados no Brasil pertence à ordem Lepidoptera. A utilização de feromônio sexual em armadilhas adesivas tem sido eficiente no monitoramento de três importantes pragas pertencentes à família Gelechiidae: *Pectinophora gossypiella* (Saund.) (lagarta-rosada-do-algodoeiro), *Phthorimaea operculella* (Zeller) (traça-da-batatinha) (VILELA, 1988) e *Tuta absoluta* (Meyrick) (traça-do-tomateiro) (ATTYGALLE et al., 1995; SVATOS et al. 1996).

O feromônio da broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) tem sido utilizado na determinação da sua flutuação populacional (ALMEIDA; ARRRIGONI, 1989; BOTELHO et. al, 1993), na determinação da sua dispersão (BOTELHO et al., 1978) e na tentativa de controle por meio de coleta massal (LIMA FILHO; RISCADO, 1988; TERAN et al., 1985; TERAN; REZENDE, 1987).

Na família Tortricidae, foram descobertos os feromônios sexuais de duas importantes pragas no Brasil, hoje sintetizados, e vendidos comercialmente. O primeiro caso, foi a identificação de 3E,5Z-acetato de dodecadienila, feromônio sexual da lagarta enroladeira da macieira *Bonagota cranaodes* (Meyrick), por Unelius et al. (1996). O segundo caso, foi a descoberta, identificação e síntese do feromônio sexual do bicho-furão dos citros, *Ecdytoplopha aurantiana* (Lima) por Leal et al. (2001), que é utilizado para o monitoramento desta importante praga dos citros (BENTO; VILELA; DELLA LUCIA, 2001). Outra espécie de importância na área agrícola, pertencente a esta mesma família, *Grapholita molesta* (Busck), inseto praga de frutíferas temperadas, especialmente de pessegueiro e nectarina, teve o feromônio sexual sintético utilizado no Brasil para estudo de sua dinâmica populacional (LOECK; BERTOLDI; SALLES, 1991; SILVEIRA NETO et al., 1981) e para o seu controle (SALLES MARINI, 1989).

Dentre as vantagens da utilização do feromônio, como instrumento de controle, estão a facilidade de utilização, a especificidade, o caráter não poluente e a grande compatibilidade com outros métodos de controle.

É necessário, portanto, conhecer cada situação em detalhe, para que se possa obter resposta máxima, em termos de comportamento, em relação ao feromônio estudado.

A síntese dos feromônios sexuais tem sido responsável pela utilização crescente destes compostos, no manejo e regulação de populações de inseto, seja por meio do

monitoramento, coleta massal ou confundimento de pragas (BENTO, 2001). No monitoramento, as armadilhas contendo o feromônio sexual sintético podem ser utilizadas na detecção ou determinação da incidência prematura de pragas; na determinação da distribuição de um inseto em uma dada área geográfica (ELKINTON; CARDÉ, 1981); na inspeção e prevenção quarentenária; na obtenção de estimativas populacionais (DATERMAN, 1982). Essas armadilhas, geralmente capturam indivíduos mesmo em baixa densidade populacional; sendo assim, elas são empregadas para fazer previsão da incidência de uma dada praga, contribuindo para a determinação da época de aplicação de medidas de controle na cultura (VILELA; DELLA LUCIA, 1987).

A coleta massal consiste na captura de insetos por meio de um sistema de armadilhas, contendo feromônio sintético, capaz de retirar um número significativo de indivíduos, reduzindo a população da praga a um nível aquém do de dano econômico (VILELA; DELLA LUCIA, 1987).

O confundimento de insetos pragas por meio de feromônios, consiste na impregnação da área com feromônios sintéticos, visando ao rompimento do sistema normal de comunicação entre os indivíduos, reduzindo a probabilidade de encontros e agregação dos sexos e, conseqüentemente de acasalamentos. Segundo Champion (1984), a exposição constante do inseto a um alto nível de feromônio conduz à adaptação dos receptores sensoriais olfativos da antena e à habituação do sistema nervoso central, fazendo com que o inseto não responda mais ao estímulo. Assim, a aplicação de grande quantidade de feromônio sintético numa área, impossibilita que o inseto siga a pluma de feromônio natural, provocando o confundimento (VILELA; DELLA LUCIA, 1987).

Variáveis como tamanho, cor, forma das armadilhas, altura de colocação em relação ao solo e local de instalação, formulação, proporção dos componentes e dose do feromônio, podem ser determinadas ou corrigidas a partir do conhecimento do comportamento dos insetos.

Para o desenvolvimento destas armadilhas são necessárias várias etapas desde a verificação da existência de um feromônio, até sua identificação, síntese e testes de eficiência no campo (LINGREN; HENNEBERRY; BARIOLA, 1980).

Etapas intermediárias, envolvendo estudos comportamentais, permitem caracterizar o sistema de comunicação da espécie-praga, e assim, otimizar o desempenho das armadilhas quando instaladas no campo (VILELA; DELLA LUCIA, 1987).

Os estudos de comportamento de insetos visando à obtenção e síntese de feromônios sexuais, vêm aumentando muito nos últimos anos, principalmente entre os insetos da ordem Lepidoptera e mais freqüentemente entre os microlepidópteros. O número de feromônios sintéticos, incluindo os de insetos de outras ordens como Coleoptera, passaram de 100 em 1987 para mais de 1.500 no final do século 20 (TILLMAN et al., 1999).

O uso de feromônio sexual tem se mostrado eficiente e promissor, para o manejo de insetos-praga em um grande número de culturas. A procura pelos consumidores em todo o mundo por produtos cada vez mais livres de agroquímicos deverá favorecer o emprego mais intensivo dos feromônios como estratégia de controle entre os produtores nos próximos anos (BENTO et al., 2001).

### **2.1.6 Feromônio sexual de *P. citrella***

Embora os feromônios sejam, geralmente substâncias químicas simples, a grande maioria dos feromônios sexuais de Lepidoptera é constituída de mais de um componente. Em um só reservatório de uma glândula, podem existir, mais de 30 componentes.

O primeiro exemplo de um feromônio multicomponente em Lepidoptera [mistura de (Z,E)-9,12-acetato de tetradecadienila-(Z,E)-9,12-TDA- e (Z)-9-acetato de tetradecenila -(Z)-9-TDA-], ambos componentes do feromônio sexual de *Spodoptera eridania* (Cramer) foi identificado por Jacobson et al. (1970).

Pelo fato de ser multicomponente, o feromônio sexual produzido por um dos sexos de uma determinada espécie de inseto, pode eventualmente atrair insetos do sexo oposto de uma outra espécie que possua como constituinte do seu feromônio, um ou mais compostos em comum (semelhantes).



O feromônio sexual da lagarta rosada é uma mistura de [(7Z,11Z)-7,11-acetato de hexadecadienila e (7Z,11E)-isômero] (HUMMEL et al., 1973; BIERL et al., 1974), sendo este último composto também identificado em fêmeas de *Sitotroga cerealella* (Olivier) (VICK et al., 1974). Essas duas espécies pertencem à família Gelechiidae. Experimentos de campo realizados na Austrália, utilizando-se os componentes do feromônio da lagarta rosada mostraram a atração de duas outras espécies de Gelechiidae (ROTHSCHILD, 1974).

Os primeiros trabalhos indicando um possível feromônio sexual de *P. citrella*, surgiram quase que por acaso, quando Ando et al. (1985) no Japão, descobriram acidentalmente num ensaio de seleção de atraentes para espécies de Gelechiidae, que o composto (Z,Z)-7,11-hexadecadienal (Z7Z11-16Ald) poderia atrair esta praga. A partir daí, este composto foi sugerido erroneamente por diversos autores como um atraente sexual de *P. citrella* (UJIYE 1990; YEN; CHANG, 1991). Contudo, testes de campo com armadilhas contendo o mesmo composto utilizado por Ando et al. (1985) falharam na China, Espanha, Itália, EUA, Turquia e Brasil (revisados em SANTANA et al., 2003). Somente no final da década de 80, Du et al. (1989) demonstraram que esse composto tratava-se, na verdade, de um forte atraente sexual para *Phyllocnistis wampella* Liu et Zeng, mostrando-se pouco atrativo para *P. citrella*. A partir daí, as pesquisas se voltaram novamente para os estudos básicos do comportamento deste inseto (PARRA-PEDRAZZOLI et al., 2006), primordiais para a identificação e síntese do seu feromônio sexual.

### **2.1.7 Procedimentos utilizados para a extração, isolamento e identificação de feromônio de insetos.**

O primeiro feromônio sexual identificado de um inseto foi o do bicho-da-seda, *B. mori* (BUTENANDT et al., 1959). Para esta identificação, foi necessária a utilização de mais de 500 mil insetos (AGOSTA, 1990), em função dos poucos recursos tecnológicos existentes na época, que impossibilitavam a análise de pequenas quantidades de material.

Com o avanço das técnicas físico-químicas de análise, principalmente da espectroscopia de massa e da cromatografia gasosa, que utilizam equipamentos com alto grau de sensibilidade e resolução, a extração de um pequeno número de insetos já é suficiente, para que se possam obter os primeiros dados espectrais da molécula.

O grande entrave para a identificação de feromônios está no fato desses materiais biologicamente ativos serem produzidos pelos insetos em quantidades extremamente baixas ( $10^{-6}$  –  $10^{-9}$ ) (NASCIMENTO; SANTANA, 2001), em meio a uma grande quantidade de compostos inativos, porém quimicamente semelhantes.

Assim, o processo de identificação requer técnicas gerais e procedimentos que permitam a obtenção de matérias naturais puros, em escala de nanogramas. O sucesso no isolamento e identificação do(s) composto(s) biologicamente ativo(s) sempre estará relacionado à escolha correta dos procedimentos analíticos.

A seguir serão descritos de forma introdutória os procedimentos utilizados para a extração, isolamento e identificação de feromônio de insetos. Para uma abordagem completa consultar Hummel e Miller (1984); Millar e Haynes (1998).

#### **2.1.7.1 Coleta de material**

A preparação de um extrato biologicamente ativo representa o primeiro importante passo na identificação de um semioquímico. Esta é uma etapa que não deve ser subestimada e considerações cuidadosas dos métodos e condições podem minimizar esforços e tempo. Existem vários aspectos a considerar : 1 – produtos naturais variam consideravelmente quanto à estabilidade; vários semioquímicos degradam facilmente e vários métodos são exigidos para minimizar esta degradação; 2 – pode ser difícil ou impossível recuperar toda a atividade em um simples extrato; 3 – A extração deve ser cuidadosamente realizada para aumentar a eficiência. Uma extração eficiente é aquela em que todo ou quase todo o material de interesse é extraído e os demais materiais (que não são de interesse) são minimizados. Dessa forma, a escolha do solvente é muito importante; 4 – cuidados devem ser tomados para minimizar contaminações do extrato natural com fontes diversas como gorduras das mãos, plásticos etc.

Jacobson (1972) relatou que diclorometano, hexano e éter eram os solventes preferidos para a extração de feromônios uma vez que eles são suficientemente voláteis para que os extratos sejam concentrados sem a necessidade de serem expostos à altas temperaturas, além do diclorometano não ser inflamável. Outro solvente que também tem sido utilizado é o benzeno (BERGER, 1972).

Dois métodos são, basicamente, mais utilizados para a coleta de feromônios: o método da aeração (coleta de voláteis) e o método da extração por solvente (extração direta da glândula). Entretanto, existem outras técnicas que serão descritas neste item e que exigem menor quantidade de solvente para a extração.

Por meio do processo de aeração, todos os voláteis emitidos pelos insetos, incluindo os feromônios, podem ser coletados. Os compostos são adsorvidos em polímeros especiais [Porapak Q (etilvinilbenzeno-divinilbenzeno; Supelco), Tenax (óxido de 2,6-difenil-p-fenileno; Supelco) Super Q, sílica gel, carvão ativado etc.] e a dessorção é realizada utilizando-se solventes como diclorometano, hexano e éter, com um alto grau de pureza. A preferência por tais solventes se deve à volatilidade dos mesmos, o que possibilita a evaporação sem que os materiais coletados sejam expostos a altas temperaturas. Ainda assim, perdas de material por arraste poderão ser observadas.

Se não for conhecida a faixa de horário do dia em que a produção de feromônios pelos insetos é mais efetiva, a coleta deve ser realizada durante um período de 24 horas.

Os sistemas de aeração utilizados geralmente são de vidro, sendo adaptada na entrada do sistema, uma coluna contendo carvão ativado, para que o ar seja pré-filtrado. A um fluxo de 1 L/min, os voláteis são arrastados até a extremidade oposta e, então, adsorvidos no polímero. Cabe ressaltar que este processo não irá, necessariamente, garantir uma total adsorção dos compostos e de todos os componentes. A utilização inicial de diferentes polímeros é recomendada, sendo que uma comparação posterior dos resultados alcançados, indicaria o melhor sistema a ser empregado para um determinado inseto. Após o tempo adequado (24 h), interrompe-se o vácuo e a coluna contendo os compostos adsorvidos é desconectada do sistema.

Uma vez aprisionados no adsorvente, dessorção térmica ou extração por solvente são empregadas para extrair o feromônio da superfície do polímero, dando-se preferência à técnica de extração de solvente. O processo de dessorção dos voláteis deve ser feito utilizando-se uma pequena quantidade de solvente (~ 2,5 mL) visando reduzir o grau de impurezas.

A metodologia mais utilizada para a coleta de feromônios é a extração por solvente pois, além da praticidade do método, ela requer um tempo muito menor para a obtenção do material, se comparado ao método da aeração. No entanto, utilizando-se este processo, o material coletado sempre irá apresentar uma quantidade muito maior de impurezas, como hidrocarbonetos, ácidos graxos e outros, visto que todo o conteúdo do inseto está sendo extraído, incluindo gorduras e cutículas. O método se torna extremamente vantajoso, quando se sabe em qual parte do corpo do inseto está localizada a glândula produtora do feromônio, pois, desta forma, a extração pode ser feita apenas nesta região específica, diminuindo consideravelmente as impurezas, facilitando as análises seguintes.

Em um procedimento padrão, os insetos são imersos em solvente (quantidade suficiente para cobri-los) e mantidos por cinco minutos. O extrato é então filtrado em uma pipeta de Pasteur contendo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, e subseqüentemente concentrado.

Embora útil, o emprego de solventes na análise de semioquímicos pode trazer algumas desvantagens, tais como diluição da amostra, reação do solvente com alguns compostos, a presença de impurezas capazes de interferir na identificação dos compostos em menor proporção e o fato de os componentes mais voláteis poderem eluir junto ao pico do solvente. Para evitar desvantagens que o uso do solvente pode trazer para a análise de semioquímicos, algumas técnicas foram desenvolvidas (BOWMAN; KARMEN, 1958; BRIDGES; GUINN, 1980; DETTNER et al., 1985; FREVOT et. al., 1982; WEATHERSON; MACLEAN, 1974).

O sistema de aprisionamento proposto por Stålberg-Stenhagen (1972) permite que os componentes voláteis aprisionados em cartuchos com adsorvente possam ser dessorvidos termicamente e transferidos para a coluna de um cromatógrafo gasoso, onde são separados. Morgan e Wadhamns (1972) desenvolveram uma técnica que permite a injeção direta de glândulas exócrinas e partes do corpo do inseto contendo o

semioquímico. Nesta técnica, as glândulas ou as partes do corpo do inseto são depositadas em capilares de vidro fechados em uma extremidade. Uma vez depositado o material de análise, a outra extremidade é selada e o capilar é então introduzido em seringa de aço inoxidável que se encontra conectada ao injetor do cromatógrafo gasoso. O tubo capilar é quebrado e os componentes voláteis são levados pelo gás de arraste até a coluna capilar, onde são então separados.

Uma outra técnica para a extração de compostos orgânicos é a da microextração em fase sólida (SPME), que consiste no emprego de uma fibra de sílica fundida, coberta por uma camada de adsorvente (polímero poroso), no qual os compostos são adsorvidos, sendo posteriormente dessorvidos termicamente no injetor do cromatógrafo gasoso (ZHANG; YANG; PAWLISZYN, 1994; MILLAR; SIMS, 1998). Vários estudos demonstram vantagens e desvantagens do método (BARLET, 1997; MATICH; ROWAN; BANKS, 1996; YANG; PEPPARD, 1995)

#### **2.1.7.2 Concentração dos extratos**

A remoção do solvente é uma das partes mais críticas deste processo. A volatilidade dos compostos, associada às pequenas quantidades, faz com que as perdas de material sejam freqüentes, diminuindo o rendimento da extração. Para que tais perdas sejam minimizadas, após a obtenção dos extratos, estes devem ser armazenados em pequenos tubos cônicos, que irão facilitar a evaporação. Um leve fluxo de nitrogênio ou argônio deverá ser suavemente passado sobre a superfície do solvente, até que seja atingida a concentração desejada.

A concentração ideal irá depender de cada caso em particular e envolve fatores como a quantidade de feromônio produzida pelo inseto. No entanto, em um primeiro estágio, as amostras podem ser concentradas para "insetos equivalentes" (IE), ou seja, supondo-se que a coleta de feromônio foi realizada com 10 insetos (independente do método utilizado), os extratos seriam concentrados para 10  $\mu\text{L}$ .

Desta maneira, ao se injetar 1  $\mu\text{L}$  no cromatógrafo, a princípio, estariam sendo analisados todos os compostos, com suas respectivas proporções, para um único

indivíduo. A partir deste dado inicial, as devidas correções de concentração podem ser feitas, caso seja necessário (ZARBIN, 2001).

Segundo Millar e Sims (1998), a concentração do extrato, quando este possui um grande volume pode ser feita utilizando-se um evaporador rotativo associado a um vácuo e a um aquecedor, sendo um mínimo de aquecimento necessário para remover o solvente (máximo 50°C).

### **2.1.7.3 Análises iniciais**

Após a obtenção dos primeiros dados cromatográficos dos extratos, o maior problema a ser enfrentado, é determinar quais compostos, dentre os vários presentes, são biologicamente ativos.

Uma maneira rápida e prática de determiná-los, é por meio da comparação dos cromatogramas obtidos pela análise dos extratos de machos e fêmeas. Uma vez que os feromônios são produzidos especificamente por um único sexo, caso sejam encontradas substâncias que estejam presentes apenas em um dos substratos analisados, isto seria um bom indicativo de serem estes, ou algum destes, os compostos ativos.

Entretanto, este tipo de comparação não é suficiente nem eficaz para a grande maioria dos casos, o que faz com que seja necessária, a utilização de técnicas mais elaboradas, que permitam uma correta atribuição dos compostos ativos.

### **2.1.7.4 Cromatografia gasosa acoplada a um detector eletroantenográfico (GC-EAD)**

A eletroantenografia (EAG) é uma técnica muito utilizada para a detecção de voláteis percebidos pelas antenas dos insetos. Este método é baseado na descoberta de Schneider (1957a) que registrou pequenas flutuações de voltagem entre a ponta e a base da antena quando esta estava sendo estimulada com feromônio. Schneider (1957b) foi o pioneiro na técnica de EAG e, estudando o comportamento eletrofisiológico no sistema olfativo de *Bombyx mori*, revelou que o potencial de recepção do

inseto ao seu feromônio poderia ser registrado utilizando-se uma antena isolada, posicionada entre dois microeletrodos capilares conectados a um amplificador e a um registrador.

Subseqüentemente a técnica do EAG mostrou-se eficiente em estudos de insetos de várias ordens, incluindo Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera a Trichoptera, (ROELOFS, 1984; JEWETT; BRIGHAM; BJOSTAD, 1996).

Schneider (1963) sugeriu que a EAG é essencialmente a soma de vários potenciais dos receptores olfativos registrados mais ou menos simultaneamente por um eletrodo localizado no epitélio sensitivo. Posteriormente Schneider (1969) interpretou os potenciais negativos destas pequenas reações elétricas dos dendritos nas células olfativas como uma despolarização da membrana do receptor. A amplitude da resposta que corresponde à freqüência do impulso nervoso gerado aumenta com o aumento da concentração do estímulo químico até o nível da saturação ser atingido.

Kaisling e Thorson (1980) resumiram informações de aspectos estruturais, químicos e elétricos das sensilas olfativas para eletroentogramas.

No geral, as antenas dos machos são providas de longos pêlos olfativos e sensilas, que contêm células receptoras que respondem aos componentes do feromônio da fêmea.

A sensibilidade e especificidade da antena do macho, aos seus componentes do feromônio, fazem do EAG uma poderosa ferramenta para a análise de componentes de feromônios e para a confirmação de suas estruturas.

Quando o EAG é utilizado isoladamente, sem um método de purificação, como por exemplo a cromatografia gasosa (GC), não apresenta grandes vantagens pois não é possível especificar quais componentes estão afetando o comportamento biológico do inseto e além disso pode-se não detectar um possível componente minoritário do feromônio.

A técnica da Cromatografia Gasosa acoplada ao Eletroantenograma (GC-EAG) foi primeiramente relatada por Moorhouse et al. (1969) como sendo um método extremamente eficaz para a detecção de feromônios, uma vez que estaria aliada à especificidade e sensibilidade do eletroantenograma a enorme capacidade analítica e de separação do cromatógrafo. Utilizando-se esta nova tecnologia, por meio de uma

simples análise do extrato bruto, pode-se determinar com total precisão, qual composto é o feromônio.

O gás de arraste fica contido em cilindros sob pressão. A escolha do gás independe da amostra a ser separada. O mais importante é a sua compatibilidade com o detector. Os gases mais empregados são hidrogênio, hélio e nitrogênio e a vazão do gás de arraste, que deve ser controlada, é constante durante a análise. O sistema de introdução da amostra (injetor ou vaporizador) no cromatógrafo gasoso consta de um bloco de metal conectado à coluna cromatográfica e à alimentação do gás de arraste. Este bloco contém um orifício com um septo, geralmente de borracha de silicone, pelo qual amostras líquidas ou gasosas podem ser injetadas com microseringas hipodérmicas. O injetor deve estar aquecido a uma temperatura acima do ponto de ebulição dos componentes da amostra, para que a amostra se volatilize completa e instantaneamente e seja carregada para a coluna. A amostra após ser injetada e vaporizada, percorre toda a coluna cromatográfica, onde é efetuada a separação dos compostos. Ao final da corrida, o fluxo (eluente) ao sair da coluna é dividido em dois, sendo que uma parte vai para o Detector de Ionização de Chamas (FID) e, conseqüentemente, o cromatograma é traçado e, a outra parte vai para o EAG, onde a resposta da antena é amplificada. Assim, obtendo-se duas detecções simultâneas, é possível saber se o composto registrado é biologicamente ativo ou não. A separação dos compostos presentes em uma amostra ocorre em diferentes tempos de retenção, dependendo da sua volatilidade. O tempo de retenção pode ser definido como o tempo transcorrido entre a injeção da amostra e a sua passagem pelo detector ou o máximo do pico cromatográfico. É importante que a temperatura da coluna seja rigorosamente controlada, para assegurar a reprodutibilidade das análises. Normalmente utiliza-se a programação linear de temperatura, por meio da qual a temperatura da coluna vai sendo aumentada gradualmente durante a análise.

Moorhouse et al. (1969) relataram que o eluente da coluna ao passar continuamente pela antena do inseto não era satisfatório uma vez que a resposta da antena era mascarada pelas flutuações (ruídos) da linha base. Uma explicação para as flutuações pode ser que em GC com colunas empacotadas, os picos maiores são comuns a 60 e 120 segundos e, a exposição da antena aos componentes do feromônio,



durante este tempo, pode causar a saturação dos receptores olfativos. O sistema de reservatório de coleta permite que os componentes passem pela antena em pulsos de três segundos, mas isto também era um fator limitante na resolução dos componentes.

O primeiro GC-EAG com eluente do GC passando continuamente pela antena foi relatado por Arn; Städler e Rauscher (1975). Este sistema utiliza colunas capilares de vidro de alta resolução nos quais os picos eluem em poucos segundos (15s ou menos) e os componentes alcançam a antena em concentrações bruscamente elevadas ou como um pulso. Nestas condições, os receptores olfativos da antena não são saturados. Este sistema é extremamente vantajoso pois, alia a sensibilidade e seletividade do EAD, à enorme capacidade analítica e de separação do cromatógrafo. Pelo fato da antena atuar como detector biológico do eluente do GC, os autores sugerem o termo Detector Eletroantegráfico (EAD).

GC-EAD possui algumas características como: (i) - um simples amplificador de alta impedância e um filtro eletrônico que permite que as respostas da antena sejam gravadas em um registrador de gráficos padrão do GC; (ii)- eletrodos que não requerem um micromanipulador para a preparação da antena; (iii)- um detector de antenas que possui extrema sensibilidade e seletividade para detecção e confirmação dos componentes do feromônio.

Os eletrodos são confeccionados de fios de prata de 1,2 mm de diâmetro, com as pontas achatadas em forma de colher e eletroliticamente cloradas com uma solução de NaCl a 1%. Uma gota de solução de NaCl a 0,75% é colocada em cada uma das pontas em forma de colher do eletrodo, locais onde são fixadas a ponta e a base da antena. Um ou dois segmentos da antena devem ser removidos para permitir contato elétrico (STRUBLE; HEINRICH, 1984).

Eletrodos capilares de vidro usados para EAG podem também ser utilizados no EAD, entretanto eles não cabem facilmente dentro do tubo de vidro de transferência do GC efluente.

Um método para se preparar a antena do inseto consiste na utilização do gel condutor de eletricidade. O gel pode ser utilizado em micropipetas, em substituição à solução salina ou pode ser aplicado na superfície de metal do eletrodo, onde a base e a ponta da antena são fixadas (Figura 1). Diferentemente da solução salina que repele

antenas hidrofóbicas, o gel estabelece facilmente um contato com a antena. A base e a ponta da antena podem ser simplesmente colocadas no interior da gota de gel aplicada sobre a superfície do eletrodo.

Na prática, géis de boa qualidade (SPECTRA 360, Parker, orange, N.J. EUA) não interferem significativamente nas respostas do EAG e podem ser usados com muitas vantagens em relação a outros métodos de preparação de antenas. Um bom gel não deve ressecar facilmente e deve manter a antena “viva” por mais de uma hora.

O tubo de vidro que transfere o GC eluente e o amplificador, são apoiados na estrutura do GC, na localização mais conveniente. O eluente do GC entra no referido tubo a cerca de 10 a 15 cm da antena preparada. A temperatura da água que forra a parede do tubo e a temperatura do umidificador do ar são controladas entre 18 e 26 °C por meio de um circulador de água. O ar é umidificado ao passar por uma garrafa contendo água. Este ar umidificado esfria o fluxo do GC e evita o ressecamento da antena.

A primeira aplicação prática do GC-EAD foi para a análise do feromônio sexual de *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) (ARN; STÄDLER; RAUSCHER, 1975).

Um bom exemplo para se avaliar as respostas do EAD e do DIC (FID) simultaneamente foi na detecção do feromônio de *Tortrix viridana* (Lepidoptera: Tortricidae) (ARN et al., 1979). O EAD do extrato natural do feromônio sexual obtido por meio da lavagem do corpo da fêmea mostrou a maior resposta no tempo de retenção de Z11-14:OAc, que coincidiu com um pequeno pico no cromatograma do DIC. O componente do feromônio Z11-14:OAc e o composto sintético produziram uma resposta no EAD com similar intensidade. A estrutura dos componentes foi confirmada por GC-MS e o composto sintético atraiu machos em condições de campo. A resposta do EAD mostrou uma resposta pouco antes do Z11-14:OAc, que corresponde ao tempo de retenção do E11-14:OAc ou Z9-14:OAc. Havia quantidade insuficiente destes componentes para serem detectados pelo GC-MS, e combinações de E11-14:OAc e Z9-14:OAc com Z11-14:OAc reduziram as capturas em condições de campo. O componente minoritário do feromônio pode ser um inibidor de atração ou pode estar relacionado com outros aspectos do comportamento de acasalamento.

A Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector eletroantegráfico (GC-EAD) (Figura 2) tem sido uma importante técnica para a detecção de componentes majoritários e minoritários do feromônio de várias espécies de lepidópteros (ARN et al., 1976, 1982; BESTMANN et al, 1979, 1980; GUERIN et al., 1982; STRUBLE et al., 1980; STRUBLE; RICHARDS, 1983).

Atualmente, são raros os trabalhos de elucidação estrutural em que este recurso não é empregado (ZARBIN, 2001). Normalmente, os componentes ativos dos feromônios registrados pelo EAD estão presentes em quantidades extremamente baixas, sendo praticamente impossível detectá-los por outro método de análise, como por meio da comparação de espectros.

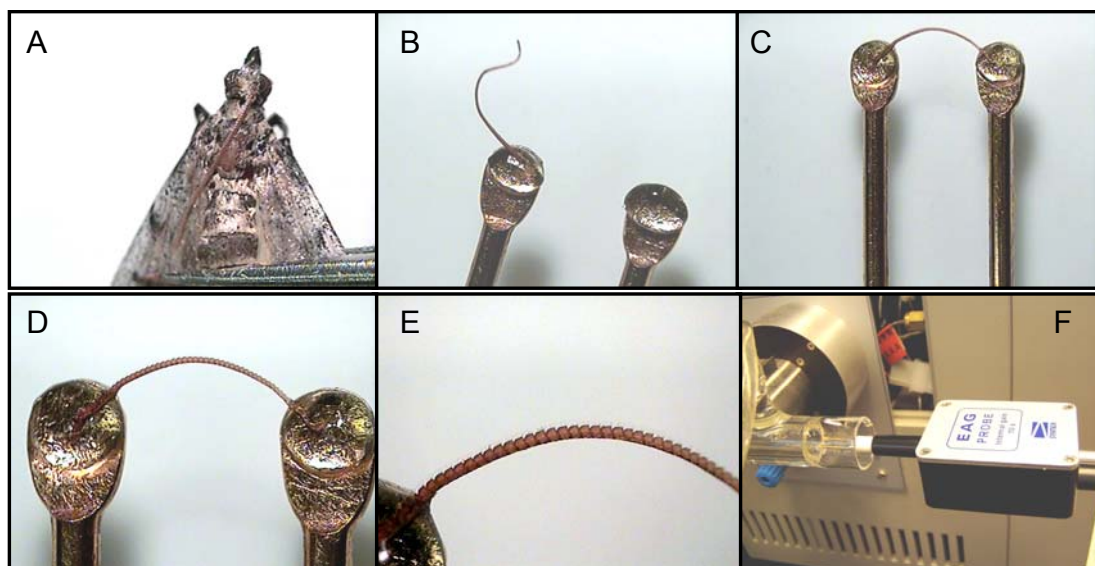


Figura 1 – Exemplo de preparação de uma antena (detector biológico do GC-EAD) utilizando-se gel condutor de eletricidade aplicado sobre a superfície do eletrodo. Universidade da Califórnia/Davis, Laboratório de Ecologia Química “Maeda-Duffey” - EUA . A – Cabeça de um lepidóptero (*Amyelois transitella*) com uma antena removida; B – Fixação da base da antena em uma das extremidades do eletrodo contendo uma gota do gel; C – Fixação da ponta da antena na outra extremidade do eletrodo também contendo gel; D e E – Detalhes da antena preparada; F – Colocação do eletrodo com a antena preparada no interior do tubo de vidro por onde passa o eluente do GC

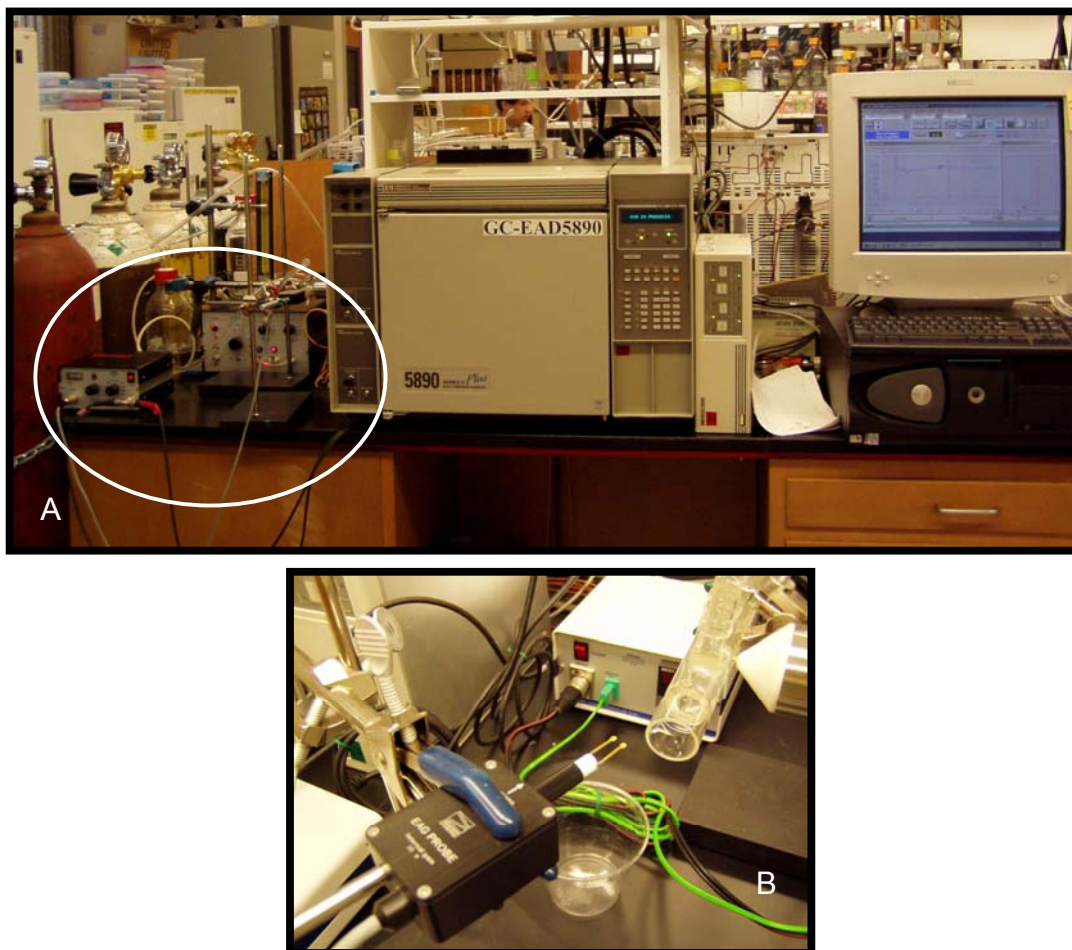


Figura 2 – A - Cromatógrafo gasoso acoplado ao detector eletroantegráfico (GC-EAD). B - Eletrodo com a antena preparada sendo colocado no interior do tubo de vidro por onde passa o eluente do GC. Universidade da Califórnia/Davis, Laboratório de Ecologia Química “Maeda-Duffey”- EUA

#### 2.1.7.5 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

Uma vez conhecido(s) o(s) composto(s) biologicamente ativos(s), inicia-se a etapa de elucidação estrutural. Dessa forma, o primeiro espectro a ser realizado é, normalmente, o espectro de massa. Apenas uma pequena quantidade de material é exigida para a análise, sendo que as informações obtidas são fundamentais para a determinação estrutural da molécula.

O fato de o equipamento utilizado estar acoplado a um cromatógrafo a gás (GC-MS), faz com que os espectros adquiridos, sejam referentes a compostos quimicamente puros.

Para identificação de feromônios, os métodos comumente empregados para ionizar e fragmentar os compostos são os de ionização química (CI) e de impacto de elétrons (EI).

Essa combinação de técnicas se mostra extremamente eficiente pois, se para um determinado espectro o pico molecular não for registrado, ou for de baixa intensidade quando obtido por meio de EI, a CI é empregada para a determinação do peso molecular correto do composto, ao passo que a EI, fornece muito mais informações a respeito da estrutura, por de apresentar um número maior de fragmentações.

Bjostad, Jewett e Brigham (1996) identificaram o feromônio sexual de *Hesperophylax occidentalis* (Banks) (Trichoptera: Limnephilidae), utilizando as duas técnicas de fragmentação. Os dados obtidos por GC-MS (EI) do composto, indicaram uma massa relativa aparente de 156 e, por meio das análises dos fragmentos e comparação destes com padrões, sugeriu-se a estrutura de uma alcan-3-ona. O pico base  $m/z$  174 ( $M+18$ ), obtido por GC-MS (CI-NH<sub>3</sub>), confirmou a massa molecular 156 para o composto em questão. O tempo de retenção observado para o feromônio se mostrou inferior ao da decan-3-ona e superior ao da nonan-3-ona, utilizadas como padrões sintéticos. Isso sugeria o composto como sendo a nonan-3-ona, porém com uma ramificação metílica.

No intuito de determinar qual seria a posição trissubstituída na molécula, o esqueleto (hidrocarboneto) da estrutura foi preparado, a partir de derivatizações químicas realizadas no produto natural (descritos no item: Micro-derivatizações), visto que os espectros de massas de todos os monometil nonanos estão descritos na literatura (STENHAGEN; ABRAHAMSSON; MCLAFFERTY, 1974) e diferem significativamente entre si.

Por meio de comparações, identificou-se o hidrocarboneto obtido, como sendo o 4-metil nonano, o que indicava, mediante os dados anteriores, duas possibilidades estruturais para o feromônio; a 4-metil-nonan-3-ona ou a 6-metil-nonan-3-ona. Para se

atribuir em definitivo a estrutura química da molécula, uma análise minuciosa do espectro de massas se fez necessário. A presença dos fragmentos  $m/z$  72 e  $m/z$  84, indicaram, indubitavelmente, que tal composto era a 6-metil-nonan-3-ona.

As mesmas fragmentações, quando realizadas com a 4-metil-nonan-3-ona, deveriam apresentar fragmentos  $m/z$  70 e  $m/z$  86, os quais não estão presentes no espectro do produto natural.

#### **2.1.7.6 Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia no infra-vermelho (GC-FTIR)**

A técnica da Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia no infra-vermelho (GC-FTIR) é empregada com o objetivo de se obterem informações sobre a presença ou não de determinados grupos funcionais na molécula, como hidroxilas, carbonilas, carboxilas etc., em função destes apresentarem absorções bastante características no espectro (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1981). Este novo conjunto de dados, quando aliado aos previamente obtidos, auxilia na elucidação estrutural. As frequências de absorções no infravermelho se estendem de 200 a 5000  $\text{cm}^{-1}$ . No entanto, na identificação de feromônios (e da grande maioria das substâncias orgânicas), a região entre 600 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  é a que apresenta maior interesse.

A aquisição de um espectro no infra-vermelho de um feromônio não é um processo simples. A utilização de microcelas especiais, normalmente se faz necessário (TUMLINSON; HEATH, 1976), sendo que o composto a ser analisado deve sempre apresentar um alto grau de pureza, para que se evitem falsas conclusões. Mesmo tomando-se todas essas precauções, os espectros obtidos nem sempre são satisfatórios para identificação.

Uma maneira prática e eficiente de se obter bons espectros, tendo-se pequena quantidade de material e sem haver a necessidade de uma prévia purificação, é a utilização de um espectrômetro de infravermelho (com transformada de Fourier), acoplado a um cromatógrafo a gás (GC-FTIR). O sistema foi introduzido inicialmente, por Low e Freeman 1967, porém somente com as modificações realizadas por Bourne

et al. (1990) é que este passou a ser rotineiramente utilizado para a análise de substâncias voláteis ou volatilizáveis.

O fato de os compostos estarem presentes em fase gasosa, faz com que as frequências de absorções observadas não sejam, necessariamente, coincidentes com aquelas detectadas, quando da aquisição do espectro em fase condensada. Os valores destas frequências, para diversos grupos funcionais estão descritos em Leal et al., (1992).

Na identificação do feromônio de *Heptophylla picea* (Coleóptera: Scarabaeidae) (LEAL; YADAVA; VIJAYVERGIA, 1996), os dados obtidos pelo espectro de infra-vermelho foram decisivos para a correta atribuição estrutural. Análises preliminares indicavam a possibilidade da estrutura ser uma g-lactona, tendo esta uma cadeia lateral com duas duplas ligações. O espectro de infra-vermelho tornava clara a existência do sistema oxaciclopentan-2-ona (1772  $\text{cm}^{-1}$ ) e ainda sugeria que uma das duplas ligações seria terminal (3073 e 1641  $\text{cm}^{-1}$ ), e a outra apresentaria configuração cis (3002  $\text{cm}^{-1}$ ). Estes dados permitiram atribuir a estrutura da (Z)-7,15-hexadecadien-4-olida para este feromônio.

#### **2.1.7.7 Purificação**

Para dar continuidade ao processo de identificação, é fundamental a obtenção de amostras puras do feromônio, pois se for necessária a realização de derivatizações, um correto monitoramento dos produtos formados só é possível se estas forem realizadas a partir de um único componente. Um outro fator, é que os bioensaios devem ser realizados com compostos puros, uma vez que as impurezas químicas, normalmente, afetam a atividade biológica do produto natural (TUMLINSON; HEATH, 1976).

Várias são as técnicas empregadas para a separação dos componentes ativos de uma mistura, e a escolha entre elas é feita, basicamente, em função da quantidade de material disponível e do grau de resolução desejado (TUMLINSON; HEATH, 1976).

A cromatografia em coluna é uma metodologia bastante eficiente, amplamente utilizada e oferece certas vantagens em relação às demais; apresenta baixo custo, é

prática e o material utilizado pode ser descartado após o uso, evitando possíveis contaminações. Diferentes tamanhos e diâmetros de colunas podem ser utilizados, em função da quantidade de material a ser separado. As colunas, quando empacotadas com sílica gel, são eluídas com diferentes combinações de solventes, aumentando-se gradativamente a polaridade. Em um procedimento básico, a eluição é iniciada com hexano, seguido de misturas de hexano:éter etílico/ 95:5, 90:10, 75:25, 50:50, 25:75 e, então, éter etílico.

Bioensaios são conduzidos, no intuito de se determinar qual a fração que contém o feromônio. Este monitoramento também pode ser feito, por meio do sistema EAD.

Sabendo-se em qual gradiente de solvente o feromônio foi eluído, pode-se ter uma idéia sobre a polaridade do composto, e fazer suposições a respeito do grau de funcionalização que este apresenta.

Uma vez determinada a fração ativa, a pureza do feromônio é checada por cromatografia gasosa (GC). Se o grau de pureza obtido não for considerado satisfatório, o processo é repetido até que seja atingida a pureza desejada. Um novo sistema de solventes pode ser empregado, sendo que, normalmente, vários ciclos de fracionamento são necessários, para que se consiga uma amostra de feromônio com alto grau de pureza.

#### **2.1.7.8 Micro-derivatizações**

As micro-derivatizações são realizadas no produto natural, quando o conjunto de dados espectroscópicos obtido não foi suficiente para se definir corretamente a estrutura molecular do feromônio, mas sugere que isto seja possível por meio da análise dos produtos de degradação da molécula. Beroza (1975) discute vários tipos de reações possíveis de serem realizadas e os principais cuidados a serem tomados, tendo-se pequenas quantidades de material. Os maiores problemas enfrentados estão normalmente relacionados às perdas de material ao término da reação.

A necessidade constante em se determinar o correto número de duplas ligações e a posição em que estas se encontram na molécula, principalmente para feromônios de lepidópteros (ordem de insetos amplamente estudada), fez com que fossem feitas



várias adaptações experimentais para micro escala de métodos já conhecidos, sendo que os mais comuns são hidrogenação catalítica (BEROZA; SARMIENTO, 1966), epoxidação (SCHWARTZ; BLUMBERG, 1964), micro-ozonólise (BEROZA; BIERL, 1966) e derivatização com DMDS (Dimetil disulfeto) (VINCENTI et al., 1987).

Vários são os caminhos e técnicas empregados no processo de elucidação estrutural. Porém, a única maneira possível de se atribuir indubitavelmente a estrutura química a um feromônio é a partir da síntese desta provável estrutura, e posterior comparação dos dados obtidos com os do produto natural.

Os produtos sintéticos obtidos poderiam ainda ser comparados com o feromônio natural por meio da cromatografia gasosa em colunas quirais, sendo esta a metodologia mais eficiente empregada para a determinação da estereoquímica absoluta do produto natural (LEAL, 1991; LEAL; YADAVA; VIJAYVERGIA, 1996).

## **2.2 Material e métodos**

O trabalho foi desenvolvido parte no Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba, da Universidade de São Paulo (USP), parte no Laboratório de Ecologia Química “Maeda-Duffey” do Departamento de Entomologia da Universidade da Califórnia (Davis-EUA) e parte no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA-EUA) com a espécie *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera: Gracillariidae).

### **2.2.1 Criação de manutenção dos insetos**

Os adultos de *P. citrella*, utilizados nos experimentos foram criados em laboratório mantido a  $25,0 \pm 2,0$  °C, UR:  $65,0 \pm 10,0\%$  e fotofase de 14 h, baseando-se em Chagas e Parra (2000).

Para esta criação, foram utilizadas como hospedeiro de *P. citrella*, plantas de limão cravo (*Citrus limonia* L. Obseck) com 25 a 30 cm de altura, cultivadas em tubetes

plásticos pretos de 20 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro, contendo substrato de vermiculita e composto vegetal (1:1).

Cerca de 400 plantas foram podadas a cada dois dias, a aproximadamente 1/3 do ápice, adubadas com Pikapau Foliar® e mantidas em bandejas plásticas de 42x38x8 cm por cinco dias. Após este período, foram transferidas para as bancadas de metal em casa-de-vegetação, até a emissão das brotações, quando foram então transferidas para gaiola de postura com capacidade para 200 plantas também mantidas em tubetes, confeccionada em madeira e com 60x60x60 cm, sendo a parte superior, de tela de náilon e a parte frontal, de vidro, com uma abertura de 25 cm de diâmetro, à qual se prendeu uma manga de tecido fino do tipo “voile” possibilitando o manuseio das plantas no seu interior. As plantas foram expostas à postura por dois dias, obedecendo à proporção de um adulto para duas plantas (1:2) no interior das gaiolas. Após este período, as plantas com postura, foram colocadas em bandejas plásticas de 35x40x8 cm, mantidas em prateleiras de metal na sala de criação, por um período de 15 dias, até próximo à emergência dos adultos.

As folhas contendo as pupas de *P. citrella* foram cortadas com tesoura, e em seguida, colocadas em câmaras de emergência, constituídas de recipientes plásticos de 18x30x6 cm, com tampa, providas de seis aberturas circulares de 2,5 cm de diâmetro, com tela de náilon e/ou “voile”, para permitir a troca de ar, evitar a condensação e impedir a fuga dos adultos, sendo a base das mesmas forrada com papel de filtro umedecido, para a continuidade da criação e o restante, 80%, foram individualizadas, para obtenção de insetos virgens, os quais foram utilizados para a obtenção do extrato natural do feromônio sexual.

### **2.2.2 Individualização das pupas de *P. citrella* para a obtenção de insetos virgens**

Devido à necessidade da obtenção de insetos virgens para a extração da glândula de feromônio sexual, as pupas de *P. citrella* em estágio avançado de desenvolvimento foram recortadas com tesoura, e em seguida, cada pupa foi individualizada sem retirá-la da folha, para evitar a dessecação; cada uma delas foi mantida em tubo de vidro de 8,0 x 1,0 cm de diâmetro, contendo um pequeno pedaço

de papel de filtro umedecido para manter a folha túrgida e tampado com filme plástico de PVC (Magipack®). Estes tubos foram mantidos na vertical, em grades de metal, no interior de câmara climatizada regulada a  $25 \pm 2$  °C, UR:  $65 \pm 10\%$  e fotofase de 14 h. Os adultos, ao emergirem, foram alimentados com uma gotícula de mel puro e permaneceram isolados dentro do tubo de vidro até o momento da extração da glândula de feromônio.

### **2.2.3 Extração, isolamento e purificação do feromônio sexual de *P. citrella***

O feromônio sexual natural foi obtido por meio da dissecação da glândula produtora, localizada na porção terminal do abdômen (segmentos VIII e IX), de 5.000 fêmeas virgens de *P. citrella* com dois dias de idade (Figura 3). Esta extração foi efetuada em microscópio estereoscópico com o auxílio de micro pinças e micro tesouras, das 6:00 às 8:00h, coincidindo com o horário de ocorrência dos acasalamentos desta espécie (PARRA-PEDRAZZOLI et al., 2006). Uma vez removida a porção final do abdômen, esta foi imersa em solvente hexano bi-distilado por 1 hora. Devido à necessidade da utilização de um grande número de insetos e ao pequeno intervalo de tempo diário associado ao acasalamento, a extração foi realizada em etapas, acumulando-se diariamente cerca de 200 porções finais (glândulas) e armazenando-se este extrato natural em frascos de vidro cônicos de 0,5 ml em 'freezer'. Foi acumulado um total de 5.000 equivalentes-fêmea e este extrato natural foi transferido para ampolas de vidro, as quais foram seladas e enviadas para Davis (Universidade da Califórnia, EUA) para a identificação dos compostos.

A remoção do solvente, ou seja, a concentração do extrato foi feita por meio da passagem de um leve fluxo de gás hélio sobre a superfície do solvente, até que fosse atingida a concentração desejada.

O extrato cru foi purificado ao ser submetido à uma coluna cromatográfica com sílica gel (malha 60-200 Fischer Scientific) e eluído sucessivamente com misturas de éter-hexano na seguinte ordem: 100:0 (fração hexano), 99:1 (fração 1%), 98:2, 95:5, 90:10, 50:50, 0:100 (fração éter) (Figura 4).

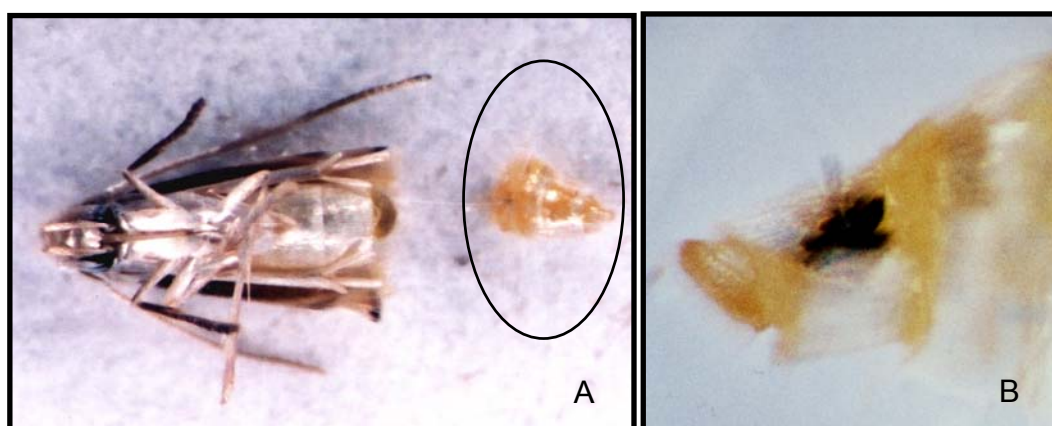


Figura 3 – A – Fêmea virgem de 2 dias de idade de *Phyllocnistis citrella* com a porção terminal do abdômen extraída (segmentos VIII e IX) e B – Detalhe da glândula de feromônio exposta, momentos antes da extração

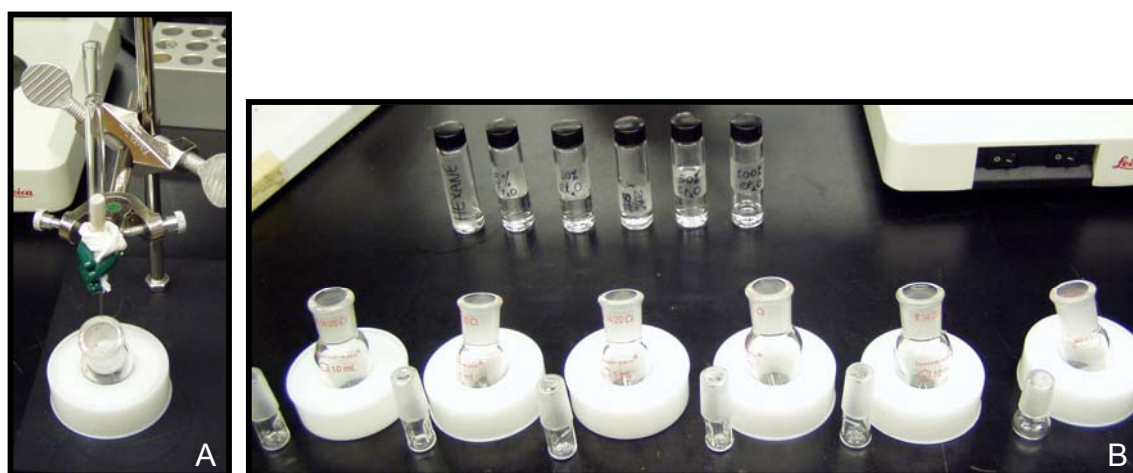


Figura 4 – A - Coluna cromatográfica com sílica gel (malha 60-200 Fischer Scientific) e B - Misturas de éter-hexano utilizados na purificação do feromônio de *Phyllocnistis citrella*

## 2.2.4 Identificação e síntese do feromônio sexual de *P. citrella*

### 2.2.4.1 Eletrofisiologia

O acoplamento do detector eletroantenográfico à cromatografia gasosa (GC-EAD) foi possível graças à inserção da cabeça extraída do macho de *P. citrella* em uma pipeta de vidro conectada a um eletrodo de prata. Utilizando-se um micromanipulador (World Precision Instruments, Sarasota, FL), a cabeça foi posicionada para uma corrente de ar purificado e umidificado (10 ml/s), proveniente de um tubo longo de vidro em forma de “L” (20cm x 7mm) mantido a uma distância de 1 cm da antena. Uma segunda pipeta, conectada a um registrador (Syntech, Hilversum, The Netherlands), fixada em um segundo micromanipulador, foi colocada em contato com a parte distal da antena cuja ponta foi removida. Ambas as pipetas foram preenchidas com solução salina Beadle-Ephrussi. Estímulos foram introduzidos na corrente de ar proveniente do efluente do GC (GC-EAD), através de um orifício no tubo de vidro, posicionado a 10 cm da antena.

As respostas do GC-EAD foram amplificadas (500x) utilizando-se um amplificador AC/DC UN-6 (Syntech). A obtenção e análise das respostas foram realizadas utilizando-se um computador equipado com uma placa de conversão de sinais analógico-digital (IDAC, Syntech), utilizando-se um software específico para GC-EAD (Syntech).

Amostras do feromônio sexual de *P. citrella* foram injetadas em um cromatógrafo gasoso série 6890, contendo uma coluna DB-1 (J&W Scientific, Folsom, CA, 15 m x 0,25 mm; 0,25 µm ou 1,0 µm de espessura do filme). Inicialmente, para a análise da amostra, utilizou-se um programa de temperatura de 50°C a 280°C, aumentando-se 25 °C/min (Figura 8) e, posteriormente utilizou-se um programa de temperatura de 50°C a 280°C aumentando-se 25°C/min até 180°C, 5°C/min até 215°C e 25°C/min até 280°C (Figura 11). As temperaturas do injetor e detector foram mantidas a 280°C e o fluxo para a interface do GC-EAD, após o splitter da coluna, foi realizado com a temperatura da interface mantida a 300°C.

#### 2.2.4.2 Outros procedimentos analíticos

Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) foi conduzida tanto pelo método de ionização química (CI) quanto pelo de impacto de elétrons (EI), utilizando-se um detector seletivo de massa 5973 conectado a um Cromatógrafo Gasoso 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). A separação cromatográfica foi feita em três diferentes colunas: HP-5MS (Agilent, 30 m x 0,25 mm; 0,25  $\mu$ m), HP-INNOWAX (Agilent, 30 m x 0,25 mm; 0,25  $\mu$ m) e coluna DB-1 (J&W Scientific, 15 m x 0,25 mm ; 1,0  $\mu$ m), que foram operadas a 70°C por 1 min, aumentando-se para 250°C (ou 290°C) a taxas de 10°C/min (ou 5°C/min) sendo a temperatura final mantida por 10 min, [70(1)-10-250(10), 70(1)-5-250(10) ou 70(10)-10-290(10)]. Espectrometria de Infravermelho (IV) foi feita em um equipamento Win GC/IR Pro (Varian, Randolph, MA, EUA) com a interface do GC e a Scimitar FTS 2000 conectadas ao sistema 6890 Network GC (Agilent). A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna HP-5 (Agilent, 30 m x 0,32 mm; 0,25  $\mu$ m) operada a 100(1)-20-250(5), que significa uma temperatura inicial de 100°C por 1 min, com uma rampa de aquecimento de 20°C/min até atingir a temperatura final de 250°C, a qual foi mantida por 5 min.

#### 2.2.4.3 Síntese do (Z,Z)-7,11-Hexadecadienal

Uma solução de **4** (10,8 g; 57,8 mmol) em THF 100 ml foi adicionada à solução em THF (50 ml) de dibromopropano **3** (11,7 g; 57,8 mmol) e  $\text{Li}_2\text{CuCl}_4$  (0,203g; 0,925 mmol) a 5°C. A solução foi agitada por 2 horas, posteriormente, a temperatura foi aumentada até à temperatura ambiente e mantida ao longo de uma noite. A mistura foi adicionada em HCl diluído e extraída com éter. A camada orgânica foi lavada com água, solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (bicarbonato de sódio), solução saturada de NaCl, seca ( $\text{MgSO}_4$ ), concentrada e destilada para dar **5** (6,16 g; 26 mmol). A solução de **5** (6,16 g, 26mmol) em THF (10 ml) foi adicionada a uma solução em THF (30 ml) de acetileno de lítio em complexo de etilenodiamina (3,11 g; 33,8 mmol) e HMPA (5ml) à 5°C. A solução foi agitada por 2 horas, posteriormente, a temperatura foi aumentada

gradualmente até à temperatura ambiente e mantida ao longo de uma noite nas mesmas condições. A mistura foi adicionada em HCl diluído e extraída com éter. A camada orgânica foi lavada com água, solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, solução saturada de NaCl, seca (MgSO<sub>4</sub>), concentrada e destilada para dar **6** (4,26 g; 23,4 mmol). n-BuLi (1,6 mol/l solução em hexano; 14,6 ml; 23,4 mmol) foi adicionado em solução de THF (50 ml) de **6** (4,26 g; 23,4 mmol) à 5°C. Após 30 min, **7** (4,47 g; 23,4 mmol) em 10 ml de HMPA, foi adicionado à solução à 5°C. Após ter sido agitada por 8 horas, a reação da mistura foi adicionada em HCl diluído e extraída com éter. A camada orgânica foi lavada com água, solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, solução saturada de NaCl, seca (MgSO<sub>4</sub>), concentrada e destilada para dar **8** (3,41 g; 11,7 mmol). A mistura de **8** (3,41 g; 11,7 mmol), 5% Pd/BaSO<sub>4</sub> (0.17 g) e quinolina (1,7 g) em 30 ml de MeOH foi agitada por 3 hr em uma atmosfera com hidrogênio. A mistura foi adicionada em HCl diluído e extraída com éter. A camada orgânica foi lavada com água, solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, solução saturada de NaCl, seca (MgSO<sub>4</sub>) e concentrada a vácuo. O material residual foi cromatografado em coluna de sílica gel (hexano-éter, 9:1) para dar **9** (3,07 g; 10,5 mmol). **9** (3,07 g; 10,5 mmol) foi agitada com PTSA (ácido p-tolueno sulfônico monohidratado, 100 mg, 0,53 mmol) em 30 ml de MeOH à 60°C. A solução foi agitada por 2 hr, a mistura foi adicionada em HCL diluído e extraída com éter. A camada orgânica foi lavada com água, solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, solução saturada de NaCl, seca (MgSO<sub>4</sub>) e concentrada a vácuo para dar **10** (2,65 g, 9,41 mmol). **10** (2,65 g; 9,41 mmol) foi adicionada à 100 ml de THF e HCL diluído a temperatura ambiente. Após ter sido agitada por 1 hora, a mistura foi adicionada em água e extraída com éter. A camada orgânica foi lavada com água, solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, solução saturada de NaCl, seca (MgSO<sub>4</sub>) e concentrada a vácuo. O material residual foi cromatografado em coluna de sílica gel (hexano-éter, 9:1) para dar **1** (2 g; 8,47 mmol). IR ( $\nu_{\max}$ , film, cm<sup>-1</sup>): 2927, 2858, 2715, 1728, 1654, 1458, 1099, 1011, 914. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ : 0.90 (3H, t, J=7.5Hz); 1,27-1,42 (8H, m); 1,64 (2H, quinteto, J=7,5Hz); 2,00-2,09 (8H, 2 picos largos); 2,43 (2H, dt, J=2,1Hz; J=7,2Hz); 5,31-5,43 (4H; m); 9,77 (1H, t, J=1,8Hz). <sup>13</sup>C-NMR (75,4 MHz; CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 14,0; 22,0; 22,4; 27,0 (2C); 27,4 (2C); 28,8; 29,4; 31,9; 43,9; 129,1; 129,6; 129,8; 130,4; 202,8; GC-MS: *m/z* 236, 218, 175, 161, 147, 137, 123, 121, 109, 95, 93, 81, 69, 67, 55 (100%), 41.

#### 2.2.4.4 Síntese do (Z,Z,E)-7,11,13-Hexadecatrienal

**5** (2,37 g; 10 mmol) e NaI (2,98 g; 20 mmol) foram adicionados à acetona (50 ml) em temperatura ambiente. Após a solução ter sido agitada por 2 horas, a mistura foi adicionada em água e extraída com éter. A camada orgânica foi lavada com água, solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, solução saturada de NaCl, seca (MgSO<sub>4</sub>), concentrada a vácuo. O material residual foi cromatografado em coluna de sílica gel (hexano-éter, 9:1) para dar **11** (2,52 g; 8,91 mmol). n-BuLi (1,6 mol/l solução em hexano, 8.4 ml, 13.4 mmol) foi adicionado a uma solução em THF (30ml) de **12** (5-cloro-1-pentino 5-chloro-1-pentyne 1,37 g; 13,4 mmol) à 5°C. Após 30 min, **11** (2,52 g; 8,91 mmol) em HMPA (5 ml) foi adicionado à solução à 5°C. Após a solução ter sido agitada por 2 horas, a mistura foi adicionada em HCL diluído e extraída com éter. A camada orgânica foi lavada com água, solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, solução saturada de NaCl, seca (MgSO<sub>4</sub>), concentrada e destilada para dar **13** (1,84 g; 7,13 mmol). **13** (1,84 g; 7,13 mmol) foi agitada com CH<sub>3</sub>COOK (1,37 g; 14 mmol) em HMPA (30ml) a 60°C. Após ter sido agitada por 2 horas, a mistura foi adicionada em HCl diluído e extraída com éter. A camada orgânica foi lavada com água, solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, solução saturada de NaCl, seca (MgSO<sub>4</sub>) e concentrada a vácuo para dar **14** (1,62 g; 5,7 mmol). A mistura de **14** (1,62 g; 5,7 mmol), 5% Pd/BaSO<sub>4</sub> (0,081g) e quinolina (0,81 g) em MeOH (10ml) foi agitada por 1 hora em uma atmosfera com hidrogênio. A mistura foi adicionada em HCl diluído e extraída com éter. A camada orgânica foi lavada com água, solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, solução saturada de NaCl, seca (MgSO<sub>4</sub>) e concentrada a vácuo. O material residual foi cromatografado em coluna de sílica gel (hexano-éter, 9:1) para dar **15** (1,45 g; 5,13 mmol). A solução de **15** (1,45 g; 5,13 mmol) em MeOH (5ml) foi adicionada à solução de MeOH (20ml) de KOH (0,56 g; 10 mmol) e água (2ml) à 5°C. Após ter sido agitada por 1 hora, a mistura foi adicionada em água e extraída com éter. A camada orgânica foi lavada com água, solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, solução saturada de NaCl, seca (MgSO<sub>4</sub>) e concentrada a vácuo. O material residual foi cromatografado em coluna de sílica gel (hexano-éter, 5:5) para dar **16** (1,1 g; 4,62 mmol). Diclorocromato de piridínio (PDC) foi adicionado à solução de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de **16** (370 mg; 1,54 mmol) à 5°C. A solução foi agitada por 2 horas, posteriormente a



temperatura foi aumentada gradualmente até à temperatura ambiente e mantida ao longo de uma noite nas mesmas condições. A mistura foi cromatografada em coluna de sílica gel com éter e concentrada a vácuo para dar **17** (294 mg; 1,23 mmol). n-BuLi (1.6 mol/l solução em hexano, 1,6 ml; 2,46 mmol) foi adicionada a solução THF (20 ml) de **18** (1,01 g; 2,46 mmol) a -20°C. Após ter sido agitada por 30 min, a temperatura foi gradualmente aumentada até a temperatura ambiente. Após ter sido mantida à temperatura ambiente por 1 hora, a solução foi resfriada à -100°C. **17** (294 mg; 1,23 mmol) em THF (2ml) foi adicionada à solução a -100°C. Após ter sido agitada por 2 horas, a mistura foi adicionada em água e extraída com hexano. A camada orgânica foi lavada com água, solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, solução saturada de NaCl, seca (MgSO<sub>4</sub>) e concentrada a vácuo. O material residual foi cromatografado em coluna de sílica gel (hexano-éter, 95:5) para dar **19** (288 mg; 0,987 mmol). **19** (288 mg; 0,987 mmol) foi agitada com ácido p-tolueno sulfônico monohidratado (PTSA, 9,6 mg; 0,05 mmol) em MeOH (30ml) a 60°C. Após ter sido agitada por 2 horas, a mistura foi adicionada em água e extraída com éter. A camada orgânica foi lavada com água, solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, solução saturada de NaCl, seca (MgSO<sub>4</sub>) e concentrada a vácuo para dar **20** (249 mg, 0,888 mmol). **20** (249 mg; 0,88 mmol) foi adicionada a 10 ml de THF e solução de HCL diluída à temperatura ambiente. Após ter sido agitada por 1 hora, a mistura foi adicionada em água e extraída com éter. A camada orgânica foi lavada com água, solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, solução saturada de NaCl, seca (MgSO<sub>4</sub>) e concentrada a vácuo. (7Z,11E,13E)-7,11,13-hexadecatrienal foi removido como um aduto da reação de Diels-Alder, realizada com tetracianoetileno. O material residual foi cromatografado em coluna de sílica (hexano-éter: 9:1) para dar **2** (110 mg; 0,47 mmol). IR ( $\nu_{\max}$ , film, cm<sup>-1</sup>): 2927, 2854, 2715, 1728, 1651, 1458, 1076, 983. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,02 (3H, t, J=7,5Hz), 1,31-1,41 (4H, m), 1,57-1,66 (2H, m), 2,00-2,26 (8H, m), 2,42 (2H, dt, J=1,8 and 7,5Hz), 5,26-5,43 (3H, m), 5,71 (1H, dt, J=6,6 e 15,0 Hz), 5,96 (1H, t, J=11,1Hz), 6,29 (1H, ddt, J=1,5, 11,1 e 15,0 Hz), 9,76 (1H, t, J = 1,8Hz). <sup>13</sup>C-NMR (75,4 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 13,6; 22,0; 25,9; 27,0; 27,3; 27,8; 28,8; 29,4; 43,9; 124,6; 129,0; 129,2; 129,3; 130,0; 136,5; 202,8. GC-MS: *m/z* 234, 205, 173, 149, 135, 121, 107, 95 (100%), 79, 67, 55, 41.

(Z)-7- e (Z)-11-Hexadecenal foram comprados de fonte comercial (Shin-Etsu Chemical Co. Ltd, Tokyo).

### 2.2.5 Formulação e Avaliação de Campo

Constituintes do feromônio sintético em hexano foram enviadas para o Brasil por correio e mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso. Cerca de duas horas antes da instalação do experimento no campo, as misturas foram incorporadas em septos de borracha (Aldrich) (Figura 5) em duas diferentes dosagens, baixa ( $50\mu\text{g}$ ) e alta ( $500\mu\text{g}$ ), respectivamente; na proporção trieno:dieno, 3:1 e trieno:dieno:monoeno, 30:10:1. O experimento constou de 6 tratamentos: (A) Mistura binária, baixa dose (trieno + dieno, 3:1,  $50\mu\text{g}$ ); (B) mistura binária, alta dose (trieno + dieno, 3:1,  $500\mu\text{g}$ ); (C) mistura terciária, baixa dose (trieno + dieno + monoeno, 30:10:1,  $50\mu\text{g}$ ); (D) mistura terciária, alta dose (trieno + dieno + monoeno, 30:10:1,  $500\mu\text{g}$ ); (E) 5- Fêmeas virgens com 2 dias de idade; e (F) controle (armadilha sem feromônio).

Os septos, contendo os atraentes e os demais tratamentos, foram colocados no interior de armadilhas modelo delta (CP<sub>2</sub> Ltda., Brasil), distribuídas, ao acaso, em plantas de citros da variedade Natal, com 2 anos de idade, plantadas em um espaçamento de 7 x 4 m (Fazenda Quatrimãs, Botucatu, SP, Brasil) a uma altura de 1.6 m, sendo a distância entre as armadilhas de 30m. A instalação das armadilhas contendo os diferentes tratamentos, foi realizada pouco antes do anoitecer (Figura 6), a fim de se evitar uma possível degradação dos componentes do feromônio pela ação do sol. O número de insetos capturados nas armadilhas foi observado por três dias consecutivos (Figura 7), sendo que, diariamente, após a avaliação, as armadilhas foram recasualizadas e as fêmeas virgens substituídas. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo os resultados de captura transformados em  $\sqrt{(x+0.5)}$  e submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados de captura dos insetos ao longo tempo (três dias) foi estudado a partir de uma análise de regressão cujo modelo é representado por  $y = - 5,9821x + 21,325$  ( $R^2 = 0,9698$ ).

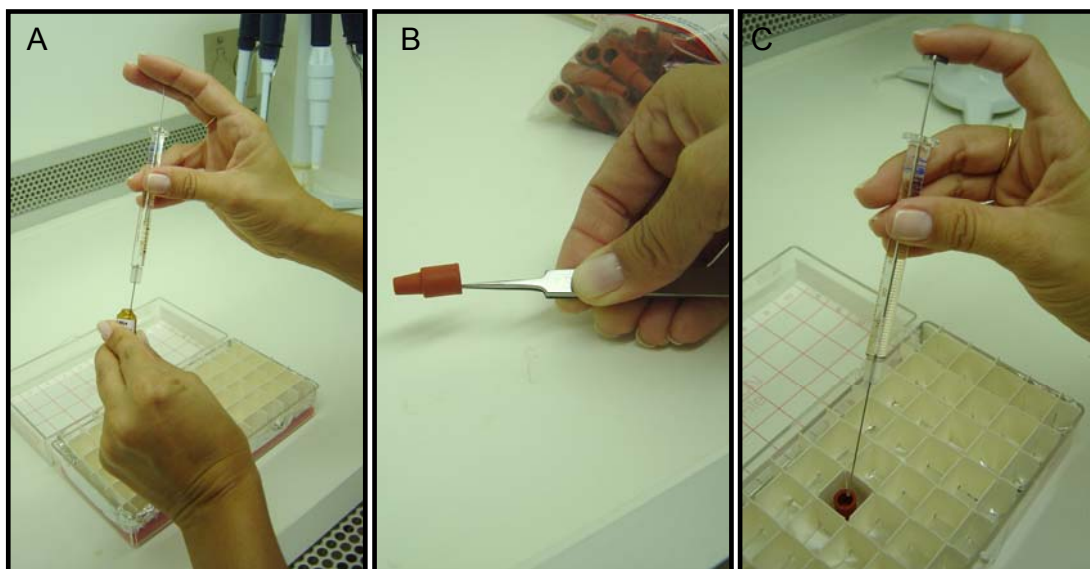


Figura 5 – Preparação do septo de borracha (Aldrich) com as misturas do feromônio sintético de *Phyllocnistis citrella*. A – Componentes do feromônio sendo dosados com seringa; B – Septo de borracha; C – Septo de borracha sendo impregnado com os componentes do feromônio



Figura 6 - Instalação das armadilhas, contendo os diferentes tratamentos, pouco antes do anoitecer a fim de se evitar uma possível degradação dos componentes do feromônio de *Phyllocnistis citrella* pela ação do sol. A – Colocação da armadilha na planta de citros; B – Colocação do septo impregnado com mistura do feromônio de *Phyllocnistis citrella*; C – Detalhe do septo no interior da armadilha; D – Detalhe da armadilha preparada na planta

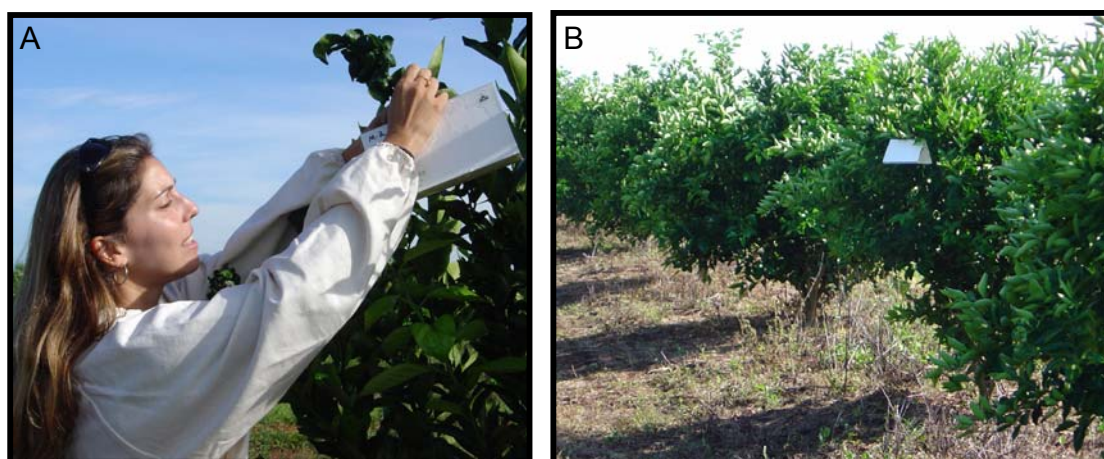


Figura 7 – A - Avaliação do número de machos de *Phyllocnistis citrella* capturados na armadilha e B – Posição da armadilha na planta

## 2.3 Resultados e discussão

### 2.3.1 Identificação e síntese do feromônio sexual de *P. citrella*

A atração dos machos de *Phyllocnistis citrella* pelo extrato natural de glândulas de feromônio de fêmeas virgens já foi demonstrada, anteriormente, em laboratório (PARRA-PEDRAZZOLI et al., 2006). Este mesmo extrato quando foi submetido a uma coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária polar, apresentou atividade comportamental semelhante para os machos de *P. citrella* na fração 2%. Para determinar os constituintes ativos nesta fração, utilizou-se um GC-EAD com a antena do macho de *P. citrella* como detector biológico. Três picos ativos no EAD (A, B e C) foram identificados (Figura 8), sendo uma atividade residual do pico C também detectada na fração subsequente (5%). Esta eluição padrão sugeriu que os três compostos pertenceriam ao mesmo grupo funcional. Embora não claramente identificados nas análises do GC-MS no modo de impacto de elétrons (EI) (Figura 9), espectros do CI-MS indicaram que os pesos moleculares de A, B e C foram 236, 238 e 234, respectivamente. Baseando-se nos tempos de retenção dos hidrocarbonetos saturados padrão, hipotetizou-se que os três compostos eram hexadecadienal, hexadecenal, e hexadecatrienal, respectivamente. Visando comparar os compostos ativos no GC-EAD com o atraente previamente identificado, preparou-se uma amostra do (*Z,Z*)-7,11-hexadecadienal (**1**) em 14,7% rendimento total, iniciando com dibromopropano (Figura 10). O composto sintético Z7Z11-16Ald foi indistinguível do pico A no espectro de massa e apresentou um tempo de retenção idêntico em coluna polar e apolar (HP-5MS, DB-1, e HP-INNOWAX). A estereoquímica ZZ do 7,11-hexadecadienal natural foi posteriormente confirmada por GC-FTIR, que demonstrou uma banda de estiramento característica de ligações *cis* C-H (intensidade média) a 3012 cm<sup>-1</sup> (LEAL, 1998). Posteriormente, testou-se se o monoeno B era biossinteticamente relacionado com o dieno A. MS de ambos (*Z*)-7- e (*Z*)-11-hexadecenal foram similares àqueles do produto natural. Os tempos de retenção do (*Z*)-7-hexadecenal e B em três colunas capilares foram idênticos, mas o do (*Z*)-11-hexadecenal diferiu (ou seja, HP-5MS, 70(1)-10-250(5); Z11-16Ald, 14,27 min; B, 14,16

min). Devido à pequena quantidade de amostra disponível, não foi possível determinar analiticamente (GC-IR) a estereoquímica da dupla ligação. Entretanto, o tempo de retenção do isômero-E diferiu daquele do produto natural (ou seja, HP-5MS, 70(1)-10-250(5); E11-16Ald, 14,21 min; produto natural, 14,16 min). Adicionalmente, análises posteriores do GC-EAD confirmaram que o pico B foi precisamente (Z)-7-hexadecenal (Figura 11). Hidrogenação da fração contendo os picos A, B, and C (50 equivalente-glândula) gerou o 16Ald saturado, sugerindo que o pico C era o aldeído relatado com três insaturações. A tentativa de se determinar a posição das duplas ligações por meio de reações de DMDS não foi satisfatória. Com uma amostra de 2.500 equivalente-fêmea, obteve-se um sinal (traçado) do GC-IR (Figura 11). Uma banda de intensidade média a ca.  $3018\text{ cm}^{-1}$  sugeriu que C tivesse duas duplas ligações na configuração *cis* assim como observado em A (dados não demonstrados), ao passo que uma banda fraca a ca.  $980\text{ cm}^{-1}$  indicou uma dupla ligação combinada na configuração *trans*. Notou-se também uma banda de carbonila a  $1742\text{ cm}^{-1}$ , típica de aldeídos (LEAL, 1998). Em dienos ZE conjugados a banda *trans* ( $940\text{-}990\text{ cm}^{-1}$ ) normalmente aparece dobrada, enquanto que uma única banda é característica de dienos EE (LEAL, 1998). Devido à pequena quantidade de amostra do feromônio e conseqüentemente da pequena resolução das bandas pequenas, não ficou claro onde a banda *trans* era um pico único ou dobrado. Entretanto, a média intensidade da banda CH (Figura 12) sugere a ocorrência de duas duplas ligações na configuração *cis*, implicando que o dieno conjugado estava na configuração ZE. Considerando que *P. citrella* biosintetiza (Z)-7-hexadecenal, é sensato assumir que (Z,Z)-7,11-hexadecadienal é produzido pela ação seqüencial de  $\Delta 11$  desaturase no 7-monoeno (JURENKA, 2004). Semelhantemente, o trieno pode ser produzido pela ação de outra desaturase no 7,11-dieno. Em função da conjugação no carbono, ele pode ser produzido pelas desaturases  $\Delta 5$ ,  $\Delta 9$  ou  $\Delta 13$ . Baseando-se nos dados de GC-IR, o sistema 7,9,11-hexadecatrienal foi proposto, pois a configuração E9 tendo como vizinhança (e conjugado a) duas duplas ligações Z, daria uma proporção diferente das bandas *cis/trans* e, provavelmente, deslocaria a banda *trans*. Uma consulta feita na Pherolist (WITZGALL et al., 2004) indicou que, ainda que comuns em feromônios com massa corpórea reduzida, a presença de uma dupla ligação na posição 5 não é comumente encontrado em

feromônios C-16 poliinsaturados. Pode ser que as  $\Delta 5$  desaturases tenham preferências por substratos C12, como demonstrado para a biossíntese do (E, Z)-5,7- acetato de dodecadienila (ONO et al, 2001). Assim, fundamentou-se que C seria (Z,Z,E)-7,11,13-hexadecatrienal. Uma amostra do autêntico (Z,Z,E)-7,11,13-hexadecatrienal (**2**) foi sintetizado a partir do **5** em 9% de rendimento total (Figura 13). Os dados do MS e IR (Figura 12) dos produtos sintético e natural combinaram perfeitamente. Posteriormente, compararam-se os tempos de retenção do Z7Z11E13-16Ald sintético e C em três diferentes colunas capilares. Tanto o produto natural como o sintético, deram o mesmo tempo de retenção em colunas polar e apolar mesmo quando um programa de temperatura mais amena foi utilizado (ou seja, C e Z7Z11E13-16Ald apareceram a 41.02 min em HP-INNOWAX com uma rampa de aquecimento de 2,5°C/min, com temperatura inicial de 70°C por 1 min e final de 250°C por 10 min). Concluindo, foram identificados três compostos fisiologicamente ativos da glândula de feromônio de *P. citrella*, chamados, (Z,Z)-7,11-hexadecadienal, (Z)-7-hexadecenal, e (Z,Z,E)-7,11-13-hexadecatrienal, correspondentes aos picos A, B, and C respectivamente (Figura 8). Estes compostos aparecem no extrato natural e na fração 2%, na proporção de 30:10:1, respectivamente.

Na família Gracillariidae, foram identificados feromônios sexuais em 11 espécies (ANDO, 2005; EL-SAYED, 2005; WITZGALL, et al., 2004). Destes, apenas dois são aldeídos, o E11-16:Ald em *Caloptilia theivora* (ANDO et al., 1985b) e (8E,10Z)-8,10-tetradecadienal em *Cameraria ohridella* (KALINOVA et al., 2003), sendo os demais álcoois e acetatos.

Em ensaios preliminares de laboratório, utilizando-se olfatômetro em Y, observou-se que os machos responderam à mistura sintética dos três compostos, pois foram atraídos para o braço do olfatômetro onde se encontrava o feromônio, exibindo o mesmo comportamento de corte observado quando eles se aproximam das fêmeas virgens (PARRA-PEDRAZZOLI et al., 2006), atestando a eficiência do produto sintético.

### 2.3.2 Formulação e Avaliação de Campo

Em condições de campo, os tratamentos contendo o feromônio sexual sintético com 2 (trieno+dieno, 3:1) ou 3 compostos (trieno + dieno + monoeno, 30:10:1), atraíram significativamente mais machos de *P. citrella* do que as fêmeas virgens e o controle (Figuras 14 e 15). Este resultado demonstrou que o feromônio sintético foi bastante eficiente, chegando a capturar 10 vezes mais machos do que as fêmeas virgens. Dentre os três compostos utilizados na mistura, o Z7Z11E13-16Ald e o Z7Z11-16Ald foram aparentemente, os constituintes essenciais do feromônio sexual de *P. citrella*, uma vez que com a adição de Z7-16Ald, não houve incremento na captura dos machos. Entretanto, a função deste componente minoritário Z7-16Ald, encontrado em menor atividade no EAD não está clara. Uma possibilidade seria uma ação antagonista, evitando que outras espécies fossem atraídas para o feromônio do minador-dos-citros. Porém, como *P. citrella* é uma espécie exótica, deverão ser realizados bioensaios com este composto em seu hábitat de origem, para confirmar esta hipótese.

Não foi observada diferença significativa na captura de *P. citrella* nos tratamentos contendo alta (500 µg) ou baixa (50 µg) doses do feromônio sintético (Figura 14). Com isso, é possível inferir que baixas doses do feromônio poderão ser utilizadas no monitoramento desta praga.

A duração da atratividade dos compostos químicos do feromônio decresceu drasticamente em um período de três dias (Figura 16). Isto ocorreu mesmo com a presença de BHT (anti-oxidante) nas formulações das misturas do feromônio colocadas nos septos de borracha. Neste caso, sugere-se o desenvolvimento de um liberador de feromônio que atue por mais tempo e libere o feromônio mais lentamente, para que haja uma maior durabilidade do produto no campo.

Lapointe et al. (2006) utilizaram as mesmas misturas terciárias (Z7Z11E13-16Ald, Z7Z11-16Ald e Z7-16Ald) e binárias (Z7Z11E13-16Ald e Z7Z11-16Ald) do feromônio de *P. citrella*, identificadas neste trabalho, na proporção de 30:10:1 e 30:10, respectivamente; em pomares de citros da Flórida, EUA. Os resultados foram semelhantes aos observados no Brasil, sendo que as capturas com a mistura binária não diferiram significativamente da mistura terciária, porém ambas foram superiores às



armadilhas sem feromônio (em branco). Além disso, também ficou evidente que a adição do terceiro composto Z7-16Ald na amostra, não aumentou a captura de *P. citrella*.

Recentemente, Ali Mafi et al. (2005) afirmaram que o atraente previamente identificado por Ando et al. (1985), o Z7Z11-16Ald, é um componente do feromônio sexual de *P. citrella* e atrai fortemente machos da espécie no Japão. Estes autores afirmam que a inatividade deste composto em outros países, provavelmente, se deve à uma diferença no sistema de feromônio dos “strains” estrangeiros. Entretanto, a tentativa destes autores em avaliar a técnica de interrupção de acasalamentos como um método de controle de *P. citrella* não foi promissora, pois embora os liberadores contendo Z7Z11-16Ald tenham sido eficazes para desorientar os machos, o número de ovos e lagartas encontrados nas brotações não diferiu significativamente do controle. A causa do insucesso, segundo os autores poderia ser devida à densidade populacional da praga, ao número de gerações em função da região, à formulação do atraente, ao comportamento de movimentação dos adultos, à localização e características da área experimental. Com base nos resultados obtidos na presente pesquisa, a falta do componente majoritário (Z,Z,E)-7,11-13-hexadecatrilal nas formulações utilizadas no Japão poderia ser a grande responsável pela menor captura, o que ainda necessita ser comprovado.

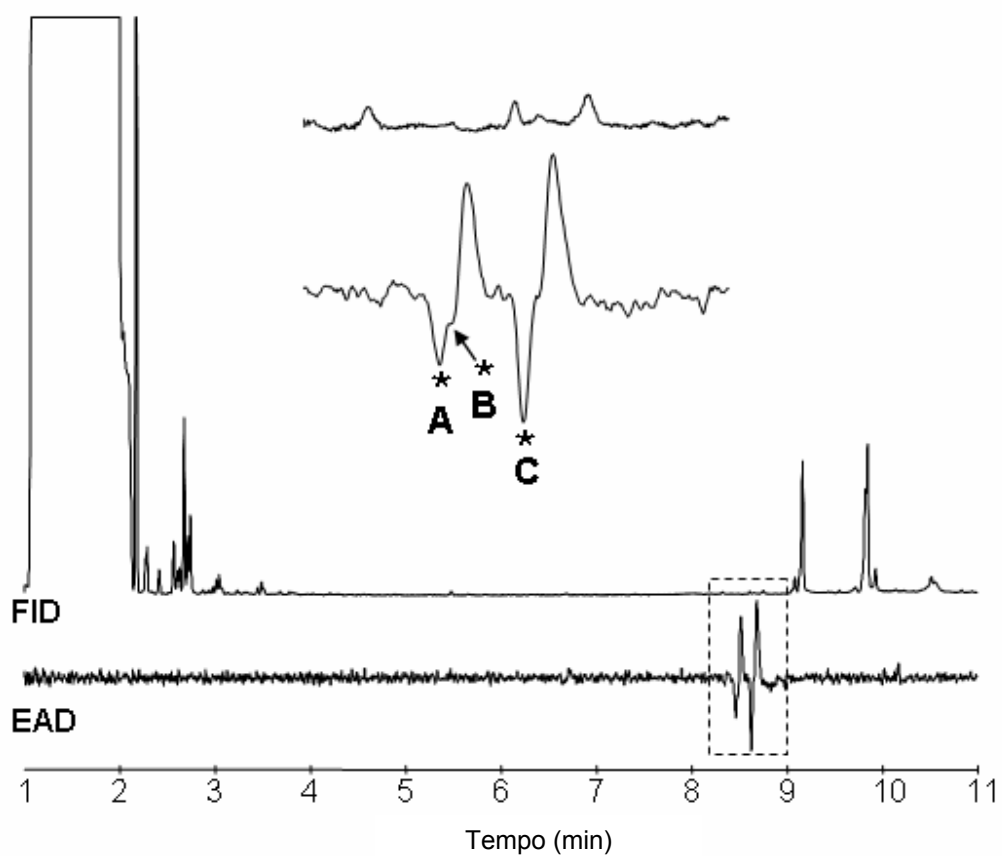


Figure 8 – Respostas simultâneas do GC (FID) e do EAD de uma antena do macho de *Phyllocnistis citrella* respondendo ao extrato do ovipositor de fêmeas da espécie (aproximadamente 8 EF). O detalhe mostra a seção aumentada com a atividade da antena indicada por \*

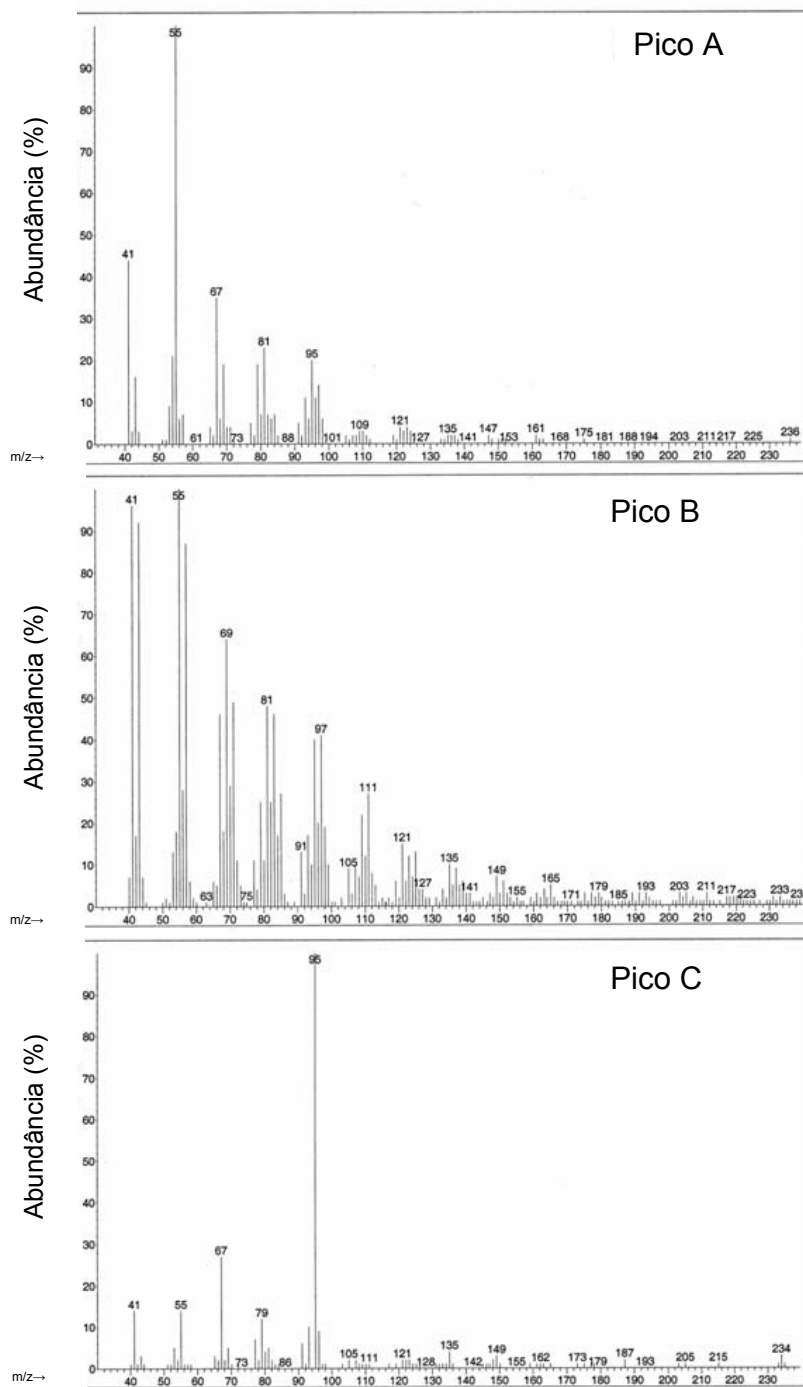


Figure 9 – Dados do GC-MS do feromônio sexual de *Phyllocnistis citrella* para os picos A, B e C

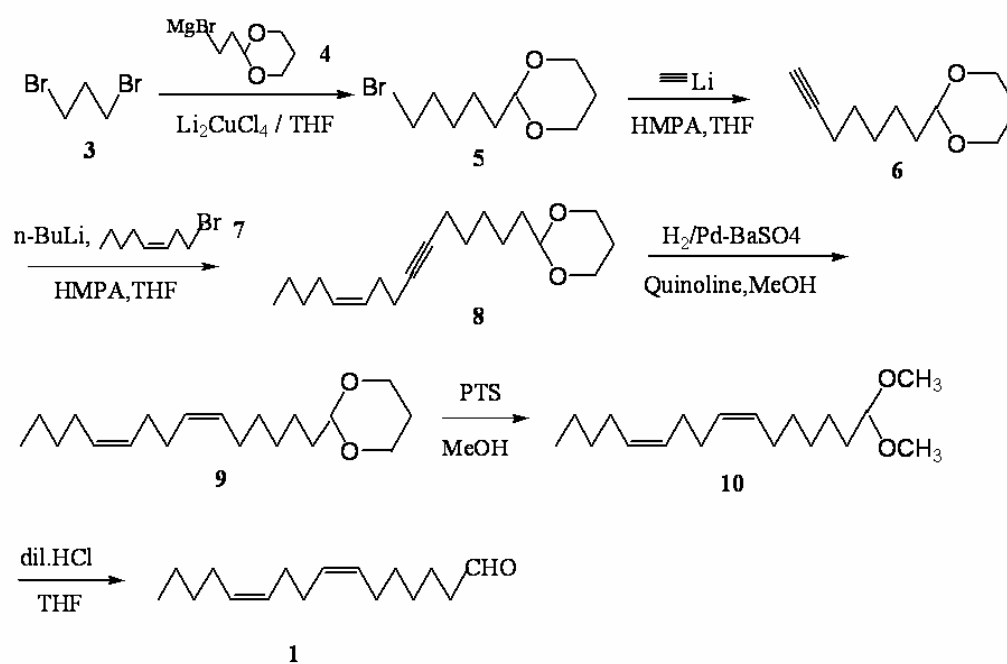


Figure 10 – Rota sintética para (Z,Z)-7,11-hexadecadienal, componente do feromônio sexual de *Phyllocnistis citrella*

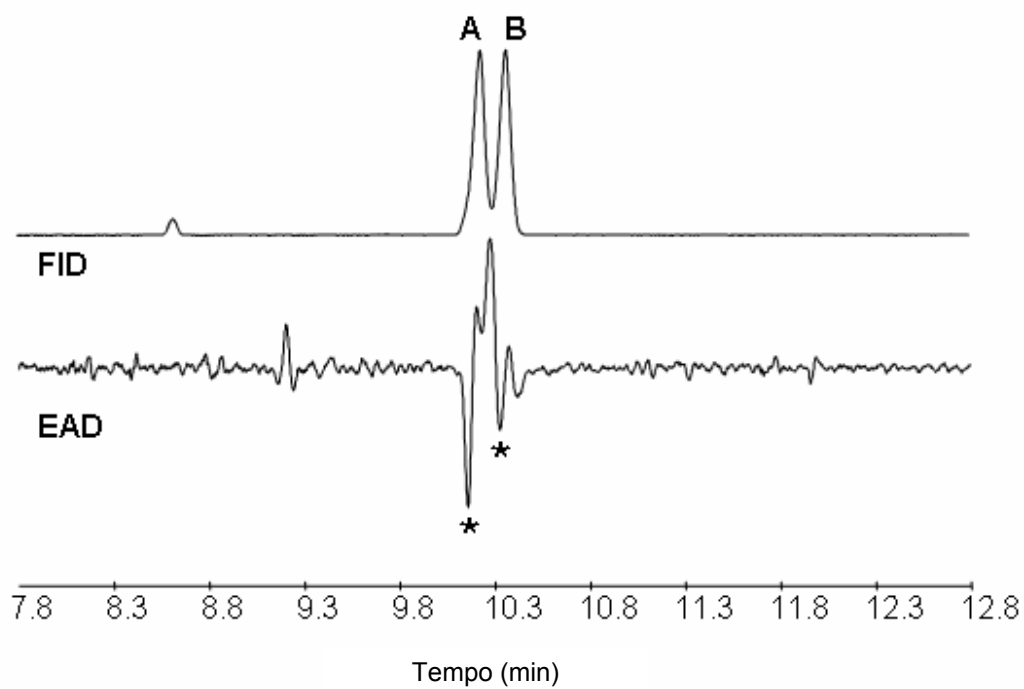


Figure 11 - Respostas simultâneas do GC (FID) e do EAD de uma antena do macho de *Phyllocnistis citrella* respondendo ao composto sintético (Z)-7-hexadecen-1-al (A) e (Z,Z)-7,11-hexadecadien-1-al (B). \* indica atividade da antena

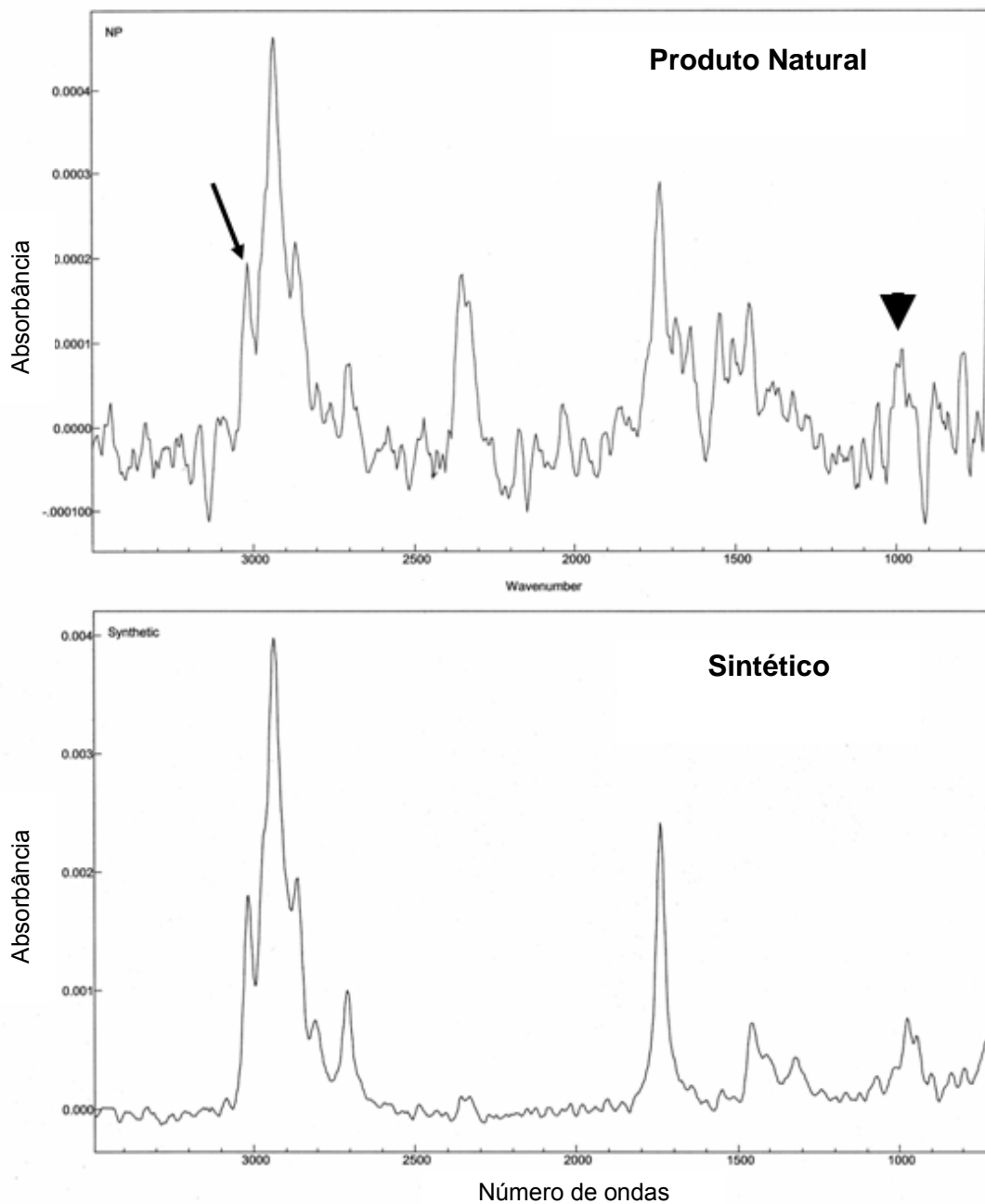


Figura 12 – Dados do GC-IR para a feromônio natural (acima) e composto sintético (Z,Z,Z)-7,11,13-hexadecatrienal (abaixo) de *Phyllocnistis citrella*. Seta e ponta da seta indicam um estiramento =CH e uma torção CH de configuração *cis* e ligação conjugada *trans*, respectivamente

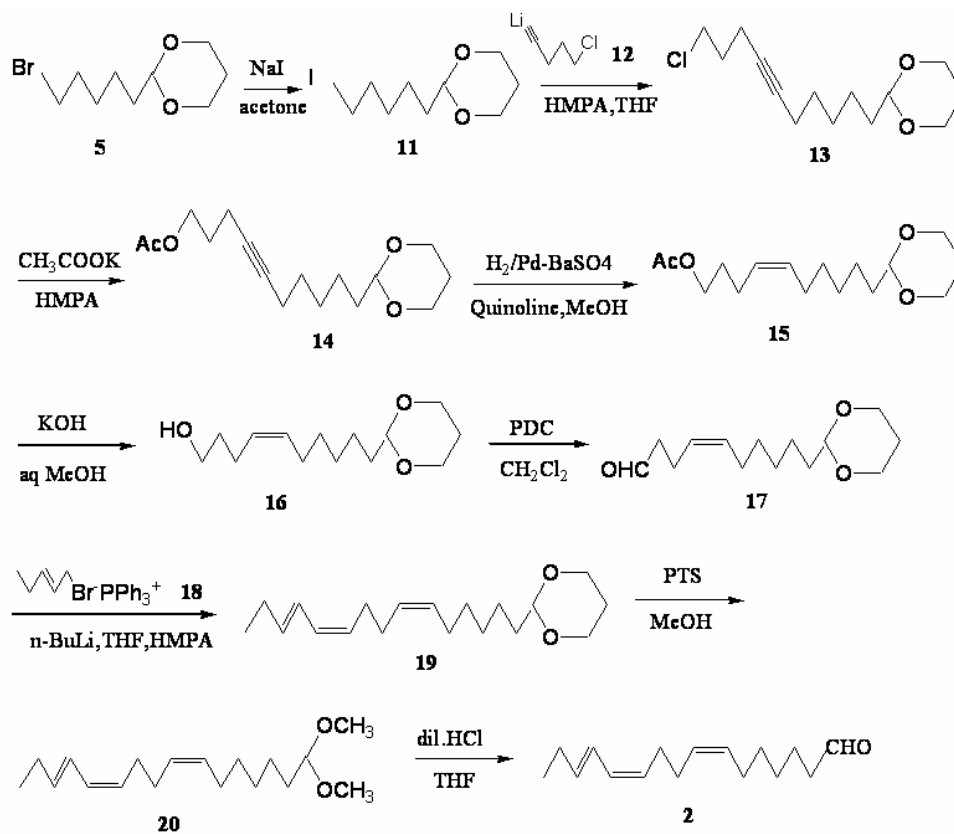


Figure 13 – Rota sintética para (Z,Z,E)-7,11,13-hexadecatrienal, componentado feromônio sexual de *Phyllocnistis citrella*

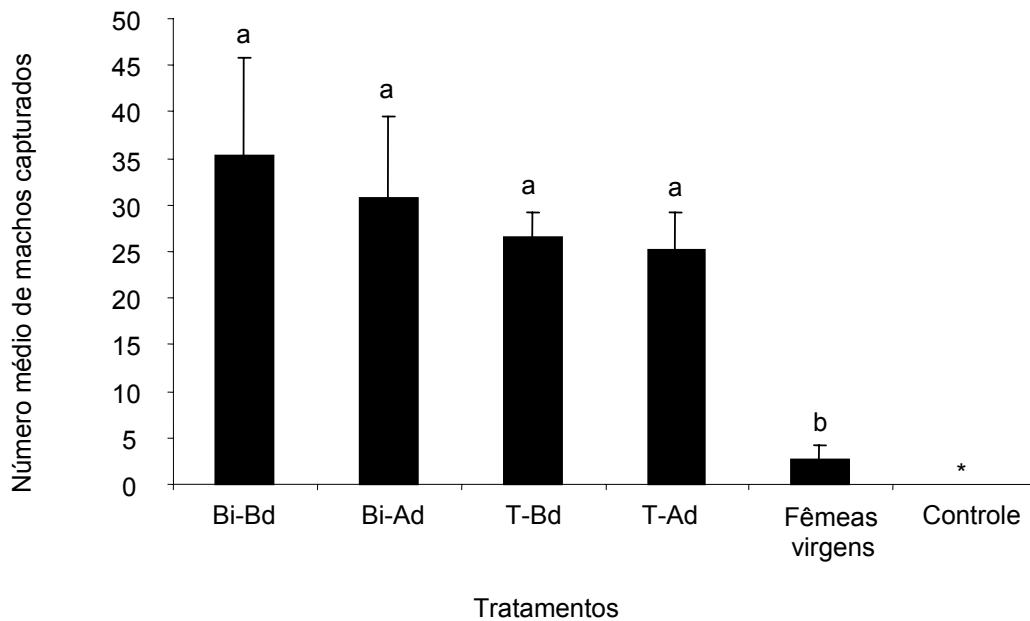


Figure 14 – Captura de machos de *Phyllocnistis citrella* em armadilhas contendo: (Bi-Bd) mistura binária em baixa dose (trieno+dieno, 3:1, 50 $\mu$ ); (Bi-Ad) mistura binária em alta dose (trieno+dieno, 3:1, 500 $\mu$ ); (T-Bd) mistura terciária em baixa dose (trieno+dieno+monoeno, 30:10:1, 50 $\mu$ ); (T-Ad) mistura terciária em alta dose (trieno+dieno+monoeno, 30:10:1, 500 $\mu$ ); (FV) 5 fêmeas virgens; e controle (armadilhas em branco). Botucatu, SP, 2005. Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% pelo teste Tukey. \* indica captura zero

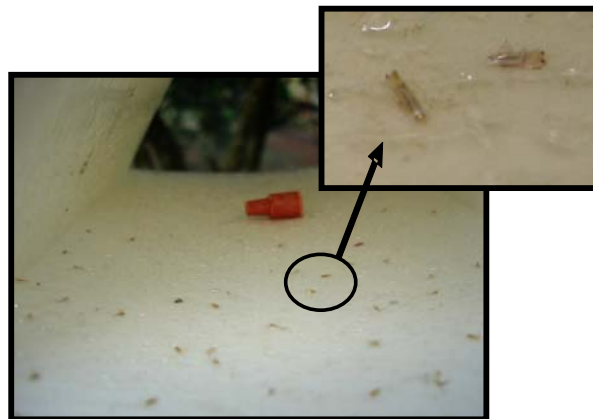


Figura 15 – Machos de *Phyllocnistis citrella* capturados em armadilha contendo mistura de feromônio (trieno+dieno, 3:1, 50 $\mu$ ) e detalhe dos mesmos aderidos à cola



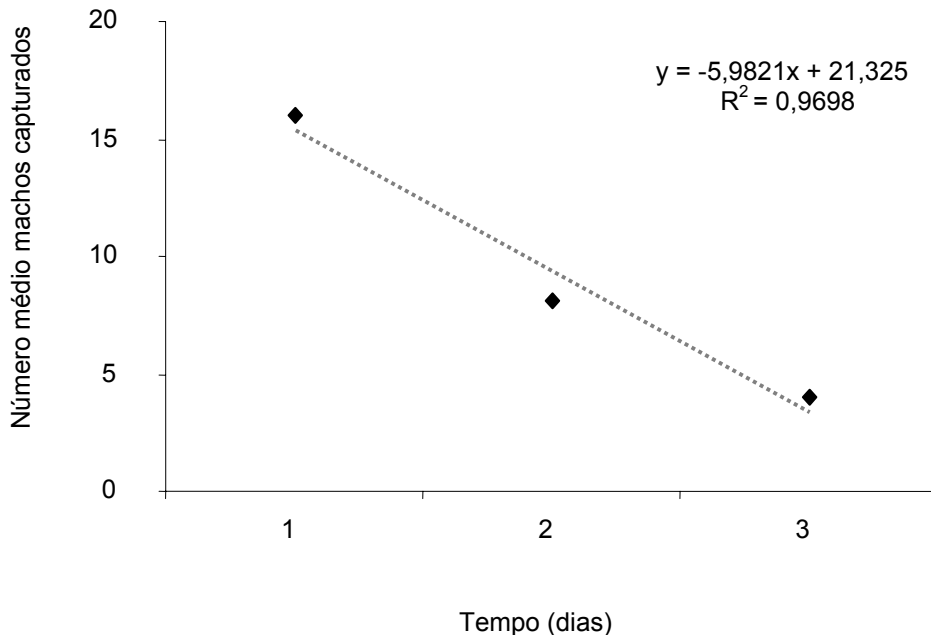


Figure 16 – Captura de machos de *Phyllocnistis citrella* em armadilhas contendo misturas do feromônio, durante três dias consecutivos. Botucatu, SP, 2005 ◆ dados observados

Para a obtenção de um feromônio sexual sintético de um inseto são imprescindíveis várias etapas (Figura 17). Para a identificação e síntese do feromônio sexual de *P. citrella*, objeto da presente pesquisa, foram necessárias as etapas de 1 a 3, desenvolvidas por Chagas e Parra (2000), Parra; Vilela e Bento (2002) e Parra-Pedrazzoli et al. (2005); e as etapas de 4 a 7 que foram realizadas na presente pesquisa. As etapas 8 e 9 deverão ser executadas em estudos futuros para disponibilizar o produto no mercado. O enorme potencial deste feromônio é evidente, mas necessita ainda ser investigado sob o ponto de vista de sua aplicação nos pomares citrícolas. Deverão ser realizados estudos para o estabelecimento de estratégias de uso deste feromônio no monitoramento para controle do minador-dos-citros, compatíveis com a filosofia do Manejo Integrado de Pragas. Assim, deverão ser determinados: (I) dose ideal de feromônio a ser utilizada por septo e/ou pastilha; (II) proporção ideal dos 3 componentes do feromônio para formulação; (III) altura ideal de instalação das armadilhas nas plantas de citros; (IV) cor, formato e tamanho ideais de

armadilha que permitam a maior captura dos machos além de uma boa visualização e contagem dos adultos capturados; (V) número de armadilhas a ser utilizado por área, baseando-se no raio de ação de cada armadilha de feromônio e (VI) eficiência de captura do feromônio em diferentes regiões citrícolas, com diferentes condições ecológicas [altitudes, temperaturas ( $^{\circ}\text{C}$ ), umidades relativas do ar (UR), etc.].

Estas pesquisas futuras serão fundamentais para que o feromônio sexual sintético, possa ser validado em condições de campo e seja disponibilizado aos citricultores do Brasil, contribuindo para a redução dos custos de produção e principalmente para a manutenção da qualidade ambiental.

Tais resultados poderão criar condições, para que, no futuro sejam desenvolvidas técnicas de coleta massal, confundimento e atrai-mata.

Assim, após mais de 10 anos de estudos com o minador-dos-citros, o presente trabalho resultou na identificação e síntese do seu feromônio sexual. Os componentes principais do feromônio, Z7Z11E13-16Ald e Z7Z11-16Ald, poderão ser formulados e oferecidos ao agricultor em curto espaço de tempo para o monitoramento de *P. citrella* em viveiros e em pomares novos, racionalizando e tornando mais eficiente o seu controle, contribuindo para a redução do cancro cítrico em nosso país. Na citricultura brasileira, o monitoramento do bicho-furão dos citros, *Ecdytoplopha aurantiana* (Lepidoptera: Tortricidae) tem sido realizado de forma eficiente por meio de armadilhas contendo o seu feromônio sexual sintético. O feromônio do bicho-furão dos citros é uma mistura de álcool e acetato (LEAL et al., 2001) e o feromônio do minador-dos-citros é uma mistura de dois aldeídos. O uso do Ferocitrus Furão<sup>®</sup> (nome comercial do feromônio sintético do bicho-furão dos citros) tem sido um importante instrumento para o controle da referida praga e espera-se que com a utilização do feromônio sexual sintético do minador-dos-citros, a implementação do Manejo Integrado na cultura dos citros seja facilitada. Como a praga encontra-se disseminada pelo Brasil, o monitoramento com o feromônio, poderá ser realizado nos diferentes estados do país. Considerando-se que *P. citrella* é uma praga cosmopolita e tendo em vista que os resultados preliminares, no Brasil, EUA (LAPOINTE et al., 2006) e Espanha (LEAL, W. S. dados não publicados), mostraram a eficiência do feromônio sintetizado na presente

pesquisa, em condições de campo, o produto poderá também ser comercializado em outros países, além do Brasil.



Figura 17 – Etapas para a obtenção do feromônio sexual sintético de *Phyllocnistis citrella*

### 3 CONCLUSÕES

Z7Z11E13-16Ald e Z7Z11-16Ald são os componentes principais do feromônio de *P. citrella*, pois a sua mistura, na proporção de 3:1, capturou um grande número de machos da espécie, sendo este número dez vezes superior ao número de machos capturados pelas próprias fêmeas virgens. Assim, comprova-se a eficiência deste

feromônio, o qual poderá ser utilizado em pomares brasileiros para monitorar a população do minador-dos-citros.

Um sistema de detecção dos adultos de *P. citrella* por meio de armadilhas contendo o feromônio sexual sintético, em pomares cítricos novos e em viveiros de mudas, poderá ser importante para prever a ocorrência da praga e tornar o seu controle mais econômico e efetivo, racionalizando as pulverizações e preservando os inimigos naturais no agroecossistema, podendo ainda indicar as áreas onde a fiscalização do cancro-cítrico deve ser intensificada.

## REFERÊNCIAS

AGOSTA, W.C. **Chemical communication: the language of pheromones**. New York: Scientific American Library, 1990.179p.

ALBA, C.G. (Ed.). **El minador de los citricos, *Phyllocnistis citrella*, Stainton. introduccion y comportamiento en España. Descripción, daños y caracterización ecológica: estrategia de lucha**. Malaga: Consejería de Agricultura y Pesca, 1996.18 p.

ALI MAFI, S; VANG, L. Van; NAKATA, Y.; OHBAYASHI, N.; YAMAMOTO, M.; ANDO, T. Identification of the sex pheromone of the Citrus leafminer (*Phyllocnistis citrella* Stainton, Lepidoptera: Gracillariidae) with a rial of control by the Communication Disruption Method. **Journal of Pesticide Science**, Osaka, v. 30, n. 4, p. 361-367, 2005.

ALMEIDA, L.C. de; ARRIGONI, E.B. Flutuação populacional de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) através de armadilhas de feromônio. **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, v. 48, p. 17-24, 1989.

ANDO, T. **Sex Pheromones of Moths**. Disponível em: <<http://www.tuat.ac.jp/~antetsu/LepiPheroList.htm>>. Acesso em : 15 nov. 2005.

ANDO, T.; TAGUCHI, K.Y.; UCHIYAMA, M.; HORIKAWA, T. Female Sex Pheromone of the Tea Leafroller, *Caloptilia theivora* Walsingham (Lepidoptera: Gracillariidae). **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 49, p. 233-234, 1985.

ANDO, T.; TAGUCHI, K.Y.; UCHIYAMA, M.; UJIYE, T.; KUROKO, H. (7z,11z)-7,11-Hexadecadienal - Sex Attractant of the Citrus Leafminer Moth, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera, Phyllocnistidae). **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 49, n. 12, p. 3633-3635, 1985.

ARGOV, Y.; ROSSLER, Y. Introduction, release and recovery of several exotic natural enemies for biological control of the citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella*, in Israel. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 24, n. 1, p. 33-38, 1996.

ARGOV, Y.; ROSSLER, Y. Rearing methods for the citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* Stainton and its parasitoids in Israel. **Biological Control**, Orlando, v. 11, n. 1, p. 18-21, 1998.

ARN, H.; STÄDLER, E.; RAUSCHER, S. The eletroantennographic detector – A selective and sensitive tool in the gas chromatographic analysis of insect pheromones. **Zeitschrift Fur Naturforschung**, Tubingen, v. 30, p. 722-725, 1975.

ARN, H.; RAUSCHER, S.; BUSER, H.R.; ROELOFS, W.L. Sex pheromone of *Eupoecilia ambiguella*: cis-9-Dodecenyl acetate as a major component. **Zeitschrift Fur Naturforschung**, Tubingen, v. 31, p. 499-503, 1976.

ARN, H.; PRIESNER E.; BOGENSCHÜTZ, H.; BUSER, H.R.; STRUBLE, D.L.; RAUSCHER, S.; VOERMAN, S. Sex pheromone of *Tortrix viridiana* (Z)-11-tetradecenyl acetate as the main component. **Zeitschrift Fur Naturforschung**, Tubingen, v. 34, p. 1281-1284, 1979.

ARN, H.; BALTENSWEILER, W.; BUES, R.; BUSER, H.R.; ESBJERG, P.; GUERIN, P.; MANI, E.; RAUSCHER, S.; SZÖCS, G.; TÓTH, M. Refining lepidopteran sex attractants. **Les Médiateurs Chimiques INRA**, Versailles, p.261-265, 1982.

ATTYGALLE, A.B.; JHAM, G.N.; SVATOS, A.; FRIGHETTO, R.T.S.; MEINWALD, J.; VILELA, E.F.; FERRARA, F.A.; UCHOA-FERNANDES, M.A. Microscale, random reduction: Application to the characterization of (3E, 8Z, 11Z)-3,8,11-tetradecatrienyl acetate, a new lepidopteran sex pheromone. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 36, p. 5471-5474, 1995.

BA-ANGOOD, S.A.S. Contribution to Biology and Occurrence of Citrus Leaf Miner, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Gracilariidae, Lepid) in Sudan. **Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie**, Berlin, v. 83, p. 106-111, 1977.

BA-ANGOOD, S.A.S. Biology and Food Preference of Citrus Leaf Miner, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Gracilariidae, Lepidoptera) in Pdr-of-Yemen. **Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie**, Berlin, v. 86, n. 1, p. 53-57, 1978.

BADAWY, A. The morphology and biology of *Phyllocnistis citrella* Stainton, a citrus leaf-miner in the Sudan. **Bulletin de la Societi Entomologique du Egypte**, Cairo, v. 51, p. 95-103, 1967.

BARLET, R.J. Calibration of acommercial solid-phase microextraction device for measuring headspace concentrationsof organic volatiles. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 69, p. 364-372, 1997.

BATRA, R.C.; SHARMA, D.R.; CHANANA, Y.R. Screening of citrus germplasm for their resistance against citrus leaf miner, *Phyllocnistis citrella* Stainton. **Journal of Insect Science**, Punjab, v. 5, n. 2, p. 150-152, 1992.

BATRA, R.C.; SANDHU, S.C.; SHARMA, S.C.; SINGH, R. Biology of the citrus leaf-miner on some rootstocks and its relationships with abiotic factors. **The Punjab Horticultural Journal**, Patiala, v. 28, n. 1/2, p. 30-35, 1988.

BELASQUE, J.; PARRA-PEDRAZZOLI, A.L.; NETO, J.R. YAMAMOTO, P.T.; CHAGAS, M.C.M.; PARRA, J.R.P.; VINYARD, B.T.; HARTUNG, J.S. Adult citrus leafminers (*Phyllocnistis citrella*) are not efficient vectors for *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, n.6, p. 590-594, 2005.

BENTO, J.M.S. Fundamentos do monitoramento, da coleta massal e do confundimento de insetos-praga. In: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.). **Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 135-144.

BENTO, J.M.S.; VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. Considerações sobre a história do estudo e emprego de feromônios no Brasil. In: VILELA E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed). **Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação**. Ribeirão Preto: Holos, 2001a. p. 147-159.

BENTO, J.M.S.; PARRA, J.R.P.; VILELA, E.F.; WALDER, J.M.; LEAL, W.S. Sexual behaviour and diel activity of citrus fruit borer *Ecdytolopha aurantiana*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 27, n.10, p. 2053-2065, 2001b.

BERGER, R.S. 2,6-Dichlorophenol, sex pheromone of the lone star tick. **Science**, Washington, v. 177, p. 704-705, 1972.

BEROZA, M. Microanalytical methodology relating to the identification of insect pheromones and related behavior-control chemicals. **Journal of Chromatographic Science**, Evanston, v. 13, p. 314-321, 1975.

BEROZA, M.; BIERL, B. Apparatus for ozonolysis of microgram to milligram of compound. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 38, p. 1976-1977, 1966.

BEROZA, M.; SARMIENTO, R. Apparatus for reaction chromatography: instantaneous hydrogenation of unsaturated esters, alcohols, ethers, ketones, and other compound types and determination of their separation factors. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 38, p. 1042- 1047, 1966.

BESTMANN, H.J.; BROSCHE, T.; KOSCHATZKY, K.H.; PLATZ, H.; VOSTROWSKY, O.; KNAUF, W. Pheromone xxx. Identifizierung eines neuartigen Pheromonkomplexes aus der Graseule *Scotia exclamatoris* (Lepidoptera). **Tetrahedron Lett**, Oxford, v. 21, p. 747-750, 1980.

BESTMANN, H.J.; VOSTROWSKY, O.; PLATZ, H.; BROSCHE, T.; KOSCHATZKY, K.H.; KNAUF, W. (Z)-7-Tetradecenylacetat, ein Sexuallockstoff für Männchen von *Amathes c-nigrum* (Noctuidae, Lepidoptera). **Tetrahedron Letters**, Oxford, p. 497-500, 1979.

BIERL, B. A.; BEROZA, M.; STATEN, R. T.; SONNET, P.E.; ALDLER, V.E. Pink boll worm Sex attractant. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 67, n. 2, p. 211-216, 1974.

BIRCH, M.C.; HAYENES, K.F. (Ed.). **Insect pheromones** London: Edward Arnold, 1982. 60p.

BJOSTAD, L.B.; WOLF, W.A.; ROELOFS, W.L. Pheromone biosynthesis in Lepidoptera: desaturation and chain shortening. In: PRESTWICH, G.D.; BLOMQUIST, G.J. **Pheromone biochemistry**. Orlando: Academic Press, 1987. p. 77-120.

BJOSTAD, L.B.; JEWETT, D.K.; BRIGHAM, D.L. Sex pheromone of caddisfly *Hesperophylax occidentalis* (Banks) (Trichoptera:Limnephilidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, p. 103-120, 1996.

BOTELHO, P.S.M.; MENDES, A.C.; MACEDO, N.; SILVEIRA-NETO-S. Cálculo da dispersão da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794). **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 92, p. 9-14, 1978.

BOTELHO, P.S.M.; MAGRINI, E.A.; SILVEIRA NETO, S.; MACEDO, N. Flutuação de machos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) através de armadilha de feromônio. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 22, p. 293-297, 1993.

BOURNE, S.; HILL, S.L.; POWELL, J.R.; PRASAD, D.R.; KRISHNAN, K. High sensitivity Fourier transform infrared spectra of gas chromatographic fractions using a liquid-nitrogen cold-trapping technique. **FTS/IS Notes**, v. 75 ,1990.

BOWMAN, R.L.; KARMEN, A. Micro-sample introduction system for gas chromatography. **Nature**, London, v. 182, p. 1233-1234, 1958.

BRIDGES, J.R.; GUINN, F.H. A solid injection technique for studying bark beetle pheromones. **Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie**, Berlin, v. 89, p. 54-57, 1980.

BROWNING, H.; PEÑA, J.E. Biological control of the citrus leafminer by its native parasitoids and predators. **Citrus Industry**, Ocala, p.12, 1995.

BUTENANDT, A.; BECKMAN, R.; STAMM, D.; HECKER, E. Über den Sexuallock-stoff des Seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und Konstituion, **Zeitschrift Fur Naturforschung**, Tubingen, v. 14, p. 283-284, 1959.

CAMPION, D.G. Survey of pheromone uses in pests control. In: HUMMEL, H.E.; MILLER, T.A. (Ed.). **Techniques in pheromone research**. New York: Springer-Verlag, 1984. p. 405-449.

CHAGAS, M.C.M.; PARRA, J.R.P. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae): Técnica de Criação e Biologia em Diferentes Temperaturas. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 227-235, 2000.

CHAGAS, M.C.M.; PARRA, J.R.P.; NAMEKATA, T.; HARTUNG, J.S.; YAMAMOTO, P. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) e sua relação com a bactéria do Cancro Cítrico *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* no Brasil. **Neotropical Entomology**, Vacaria, v. 30, n. 1, p. 55-59, 2001.

CHAGAS, M.C.M. ; PARRA, J.R.P. ; MILANO, P. ; NASCIMENTO, A.M.; PARRA-PEDRAZZOLI, A.L.; YAMAMOTO, P.T. *Agencia spis citricola*: Criação e estabelecimento no Brasil. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.) **Controle Biológico no Brasil**: Parasitóides e predadores. Barueri: Manole, 2002. p. 337-391.



CHEN, M.S.; LE, X.N. A preliminary study on *Elachertus* sp.- an ectoparasite of *Phyllocnistis citrella*. **Journal of Fujian Agricultural College**, Fuzhou, v. 15, p. 123-131, 1986.

CHIARADIA, L.A.; MILANEZ, J.M. Citrus leafminer, a new pest in citriculture in Santa Catarina. **Agropecuaria Catarinense**, Florianópolis, v. 10, n. 3, p. 20-21, 1997.

CLAUSEN, C.P. Two citrus leafminers of the far east. **Review of Applied Entomology**, London, v.19, p. 649-662, 1931. Resumo.

DATERMAN, G.E. Monitoring insects with pheromones: Trapping objectives and bait formulations. In: KYDONIEUS, A.F.; BEROZAM, M. (Ed.). **Insect supression with controlled release pheromone systems**. Boca Raton: CRC Press, 1982. p.195-213.

DETTNER, K.; SCHWINGER, G.; WUNDERTE, P. Stick secretion from two pairs of defensive glands of role beetle *Deleaster dichorus* (Grav.) (Coleoptera: Sthaphylinidae), gland morphology, chemical constituents, defensive function and chemotaxonomy. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 11, p. 859-883, 1985.

DIDONET, J.; AGUIAR, R.W.S.; PANATO, A.P. Ocorrência e infestação de larva minadora dos citros *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera; Gracillariidae) no Estado do Tocantins. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 17., 1998, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: SEB, 1998. p. 217.

DU, T.Y.; XIONG, J.J.; WANG, Z.H.; KONG, F.L. (Z,Z)-7,11-Hexadecadienal: sex attractant of *Phyllocnistis wampella* Liu et Zeng. **Insect Knowledge**, Shanxi, v. 26, n. 3, p. 147-149, 1989.

ELKINTON, J.S.; CARDÉ, R.T. The use of pheromone traps to monitor distribution and population trends of the gypsy moth. In: MITCHELL, E.R. (Ed.). **Management of insect pests with semiochemicals**. New York: Plenum Press, 1981. p. 41-55.

EL-SAYED, A.M. **The pherobase**. Disponível em <<http://www.pherobase.com>>. Acesso em: 21 dez. 2005.

FEICHTENBERGER, E.; RAGA, A. First Report of citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* (Lep: Gracillariidae) in Brazil. In: REUNIÃO INTERAMERICANA DE HORTICULTURA TROPICAL, 42., 1996, Curitiba. **Anais...** Curitiba: ISTH, 1996. p. 445.

FREVOT, B.; GALLOIS, M.; LETTERE, M.; EINHORN, J.; MICHELOT, D.; DESCOINS, C. Sex pheromone of *Pandemis heparana* (Den. And Schif.) (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 8, p. 663-670, 1982.

FUNDECITRUS. **Estatísticas do Cancro Cítrico. Fundo de Defesa da Citricultura**. Disponível em: <[http://www.fundecitrus.com.br/est\\_cancro9299\\_br.html](http://www.fundecitrus.com.br/est_cancro9299_br.html)>. Acesso em 20 out. 2005.

GARIJO, C.; GARCIA, E.J. *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Insecta: Lepidoptera: Gracillariidae: Phyllocnistidae) on citrus crops of Andalusia (South Spain): biology, ecology and pest control. **Boletín de Sanidad Vegetal- Plagas**, Madrid, v. 20, n. 4, p. 815-826, 1994.

GRAVENA, S. "Minadora das folhas dos citros": a mais nova ameaça da citricultura brasileira. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 15, p. 397-404, 1994.

GRAVENA, S. Bicho mineiro dos citros. **Laranja & CIA**, Matão, n. 44, p. 3-5, 1996.

GRAVENA, S. Manejo ecológico de pragas dos citros - aspéctos práticos. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 19, n. 1, p. 49-60, 1998.

GRAVENA, S.; BENNVENGA, S.R.; PAIVA, P. E.B.; SILVA, J.L. Efficiency of the insecticide Winner (imidacloprid) on control of some citrus pests and selectivity to natural enemies. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 13., 2000, Foz do Iguaçu. **Abstracts....** Foz do Iguaçu: EMBRAPA, 2000. p. 64.

GUERIN, P.M.; ARN, H.; BUSER, H.R.; CHARMILLOT, P.J. The sex pheromone of *Adoxophyes orana*: Preliminary findings from a reinvestigation. **Les Médiateurs chimiques INRA**, Versailles, p. 267-269, 1982.

HEPPNER, J.B. Citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella*, in Florida (Lepidoptera: Gracillariidae: Phyllocnistinae). **Tropical Lepidoptera**, Gainesville, v. 4, p. 49-64, 1993.

HEPPNER, J.B. Citrus leafminer (Lepidoptera: Gracillariidae) on fruit in Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 78, n. 1, p. 182-186, 1995.

HOY, M.A.; NGUYEN, R. Classical biological control of the citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae): theory, practice, art and science. **Tropical Lepidoptera**, Gainesville, v. 8, suppl. , p.19, 1997.

HOY, M.A.; NGUYEN, R.; POMERINKE, M.A.; BULLOCK, R.C.; HALL, D.G.; KNAPP, J.L.; PEÑA, J.E. BROWNING, H.W.; STANSLY, P.A. Classical biological control of the citrus leafminer. **Citrus & Vegetable Proceedings**, Lincolnshire, v. 109, p. 20-25, 1997.

HUANG, M.D.; LI, S.X. The damage and economic threshold of Citrus leaf miner, *Phyllocnistis citrella* Stainton to *Citrus*. In:\_\_\_\_\_. **Studies on the integrated management of Citrus insect pest**. Guangzhou: Academic Book & Periodical Press, 1989. p.84-89.

HUANG, M.L.; LU, Y.S.; QIU, Z.S.; ZHOU, Q.M.; MEN, Y.J.; LIN, S.G. Life history of *Phyllocnistis citrella* Stainton, and its occurrence. **Acta Phytophylactica Sinica**, Shanghai, v. 16, p. 159-162, 1989a.

HUANG M.D.; DHENG, C.X.; LI S.X.; MAI, X.H.; TAN, W.C.; SZETU, J. Studies on population dynamics and control strategy of the citrus leafminer. **Acta Entomologica Sinica**, Kung-Chung Hsueh Pao, v. 32, p. 58-67, 1989b.

HUMMEL, H.E.; MILLER, T.A. **Techniques in pheromone research**. New York: Springer-Verlag, 1984. 464 p.

HUMMEL, H. E.; GASTON, L.K.; SHOREY H.H.; BYRNE, K.J., SILVERST, R. M. Clarification of chemical status of pink bollworm sex pheromone, **Science**, Washington, v. 181, n. 4102, p. 873-875, 1973.

HUTSON, J.C.; PINTO, M.P.D. Two caterpillar pests of citrus. **Tropical Agriculturist**, Peradeniya, v.83, p.188-193, 1934.

JACAS, J.A.; GARRIDO, A. Differences in the morphology of male and female of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 79, n. 4 p. 603-606, 1996.

JACAS, J.A.; PEÑA, J.E. Calling behavior of two different field populations of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae): effect of age and photoperiod. **Florida Entomologist**: Gainesville, v. 85, n. 2, p. 378–381, 2002.

JACOBSON, M.; REDFERN, R.E.; JONES, W.A.; ALDRIDGE, M.H. Sex pheromone of the southern armyworm moth: isolation, identification and synthesis. **Science**, Washington, v. 170, p. 542-544, 1970.

JACOBSON, M. **Insect sex attractant**. New York: Academic Press, 1972. 382 p.

JEWETT, D.; BRIGHAM, D.L.; BJOSTAD, L.B. *Hesperophylax occidentalis* (Banks) (Trichoptera:Limnephilidae) sex pheromone structure-activity study with eletroantennograms. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, p. 123-138, 1996.

JURENKA, R. Insect pheromone biosynthesis. **Topics in Current Chemistry**, Berlin, v.239, p.97-132, 2004.

KAISSLING, K.E.; THORSON, J. Insect olfactory sensilla: structural, chemical and electrical aspects of the functional organization. In: SATTELLE, D.B.; HALL, L.M.; HILDEBRANDT, J.G. (Ed.). **Receptors for neurotransmitters, hormones and pheromones in insects**. New York: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980. p. 261-282.

KALINOVA, B.; SVATOS, A.; KINDL, J.; HOVORKA, O.; HRDY, I.; KULDOVA, J.; HOSKOVEC, M. Sex pheromone of horse-chestnut leafminer *Cameraria ohridella* and its use in a pheromone-based monitoring system. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, p. 387-404, 2003.

KARLSON, P.; LÜSCHER, M. Pheromones, a new term for a class of biologically active substances. **Nature**, London, v. 183, p. 55-56, 1959.

KNAPP, J.; PEÑA, J.; STANSLY, P.A.; HEPPNER, J.; YANG, Y. **The citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella*, a new pest of citrus in Florida**. Orlando: Cooperative Extension Service, 1994. 4p.

KNAPP, J.L.; ALBRIGO, L.G.; BROWNING, H.W.; BULLOCK, R.C.; HEPPNER, J.B.; HALL, D.G.; HOY, M. A., NGUYEN, R.; PEÑA, J.E.; STANSLY, P.A. **Citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* Stainton: current status in Flórida**. Gainesville: Florida Cooperative Extensive Service-Institute of Food and Agricultural Science. 1995. p.1-35.

LAPOINTE, S.L.; HALL, D.G.; MURATA, Y.; PARRA-PEDRAZZOLI, A.L.; BENTO, J.M.S.; VILELA, E.F.; LEAL W.S. Field evaluation of a synthetic female sex pheromone for the leafmining moth *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) in Florida citrus. **Florida Entomologist**, Gainesville, 2006. In press.

LEAL, W. S. (R,Z)-5-(1)-(oct-1-enyl)oxacyclopenta-2-one, the sex pheromone of the scarab beetle *Anomala cuprea*. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 78, p. 521-523, 1991.

LEAL, W.S. Infrared and ultraviolet spectroscopy techniques, , in MILLAR, J.G.; HAYNES, K.F. (Ed.). **Methods in Chemical Ecology: Chemical Methods**. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 185-206

LEAL, W.S.; YADAVA, C.P.S.; VIJAYVERGIA, J.N. Agregation of the scarab beetle *Holotrichia consanguinea* in response to female-released suggests secondary function hypothesis for semiochemical. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, p. 1557-1566, 1996.

LEAL, W.S.; KUWAHARA, Y.; MATSUYAMA, S.; SUZUKI, T.; OZAWA, T. GC-FTIR potencial for structure elucidation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 3, p. 25-29, 1992.

LEAL, W.S.; BENTO, J.M.S.; MURATA, Y.; ONO, M.; PARRA, J.R.P.; VILELA, E.F.. Identification, synthesis, and field evaluation of the sex pheromone of the citrus fruit borer *Ecdytolopha aurantiana* (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 27, n. 10, p. 2041-2051, 2001.

LIMA-FILHO, M.; RISCADO, G.M. Utilização de pupas fêmeas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) em armadilhas de feromônio sexual. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.17, p. 29-43, 1988.

LINGREN, P.D.; HENNEBERRY, T.J.; BARIOLA, L.A., Nocturnal behavior of adult cotton leafperforators in cotton. **Annals of Entomological Society of America**, Lanham, v. 73, n. 1, p. 44-48, 1980.

LOECK, A.E.; BERTOLDI, L.H.M.; SALLES, L.A.B. DE. Dinâmica populacional e estimativa do número de gerações de *Grapholita molesta* (Lepidoptera, Tortricidae) na região de Pelotas, RS. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 20, p. 183-192, 1991.

LOURENÇÃO, A.L.; MÜLLER, G.W.; PRATES, H.S. "Minador das folhas dos citros": praga exótica potencialmente importante para a citricultura brasileira. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 15, n. 2, p. 397-404, 1994.

LOW, M. J.D.; FREEMAN, S.K. Measurement of infrared spectra of gas-liquid chromatography fractions using multiple-scan interference spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 39, p. 194-198, 1967.

MACEDO, N.; BOTELHO, P. S. M.; RUBIM, C. A. Eficácia de inseticidas no controle da lagarta minadora dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, n. 1, p. 31-39, 1996.

MATICH, A.J.; ROWAN, D.D.; BANKS, N.H. Solid phase microextraction for quantitative headspace sampling of apple volatiles, **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, p. 4114-4118, 1996.

MILLAR, J.G.; SIMS, J.J. Preparation, cleanup, and preliminary fractionation of extracts. In: MILLAR, J.G.; HAYNES, K.F (Ed.). **Methods in chemical ecology**: Chemical Methods. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 1-37.

MILLAR, J.G.; HAYNES, K.F. **Methods in chemical ecology**: Chemical methods. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 1998. 390 p.

MOORHOUSE, J.E.; YEADON, R.; BEEVOR, P.S.; NESBITT, B.F. Method for use in studies of insect chemical communication. **Nature**, London, v. 223, p. 1174-1175, 1969.

MORGAN, E.D.; WADHAMS, L.J. Gas chromatography of volatile compounds in small samples of biological materials. **Journal of Chromatographic Science**, Evanston, v.10, p. 528-529, 1972.

NASCIMENTO, A.S.; VIDAL, C.A. Ocorrência de parasitóides e local de preferência para desenvolvimento da larva do minador das folhas dos citros *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856, em Cruz das Almas, BA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 17., 1998, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: SEB, 1998. p. 324.

NASCIMENTO, R.R.; SANT'ANA, A.E.G. Isolamento e identificação dos semioquímicos de insetos sociais. In: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed). **Feromônios de insetos**: biologia, química e aplicação. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 65-71.

NEALE, C.; SMITH, D.; BEATTIE, G.A.C.; MILES, M. Importation, Host-Specificity Testing, Rearing and Release of 3 Parasitoids of *Phyllocnistis-citrella* Stainton (Lepidoptera, Gracillariidae) in Eastern Australia. **Journal of the Australian Entomological Society**, Brisbane, v. 34, p. 343-348, 1995.

ONO, A.; IMAI, T.; INOMATA, S.; WATANABE, A.; ANDO, T. Biosynthetic pathway for production of a conjugated dienyl sex pheromone of a Plusiinae moth, *Thysanoplusia intermixta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, p. 701-708, 2001.

PANDEY, N.D.; PANDEY, Y.D. Bionomics of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae). **Indian Journal of Entomology**, New Delhi, v. 26, p. 417-426, 1964.

PARRA, A.L.G.C.; VILELA, E.F.; BENTO, J.M.S. Horário de oviposição e ritmo diário de emergência de *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) em Laboratório. **Neotropical Entomology**, Vacaria, v. 31, n. 3, p. 365-368, 2002.

PARRA, J.R.P.; BENTO, J.M.S.; CHAGAS, M.C.M YAMAMOTO, P.T. O controle biológico da larva-minadora-dos-citros. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 2, p.64-67, 2004.

PARRA, J.R.P.; CHAGAS, M.C.M.; GRAVENA, S., MILANO, P.; PARRA, A.L.G.C.; NASCIMENTO, A. M.; LEÃO, H. C de; FIALHO, A. *Ageniaspis citricola*: visão geral, três anos após sua introdução. In: SICONBIOL– SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 7., 2001, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas: SEB , 2001. p. 20.

PARRA-PEDRAZZOLI, A. L.; COOSE, A.A.; MURATA, Y.; BENTO, J.M.S.; VILELA, E. F.; LEAL, W. S. Towards identification and synthesis of the sex pheromone of the citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae). **Neotropical Entomology**, Vacaria, v. 35, n. 1, 2006. In press.

PEÑA, J.E.; DUNCAN, R. Control of Citrus Leafminer in Flórida. **Proceedings Florida State Horticultural Society**, Tampa, p. 47-51, 1993.

PEÑA, J.E.; DUNCAN, R.; BROWNING, H. Seasonal abundance of *Phyllocnistis citrella* (Lep.: Gracillariidae) and its parasitoids in South Florida citrus. **Environmental Entomology**, College Park, v. 25, n. 3, p. 698-702, 1996.

PENTEADO-DIAS, A.M.; GRAVENA, S.; PAIVA, P.E.B.; PINTO, R.A. Parasitóides de *Phyllocnistis citrella*, Stainton (Lepidoptera; Gracillariidae) no Estado de São Paulo. **Laranja**, Corderópolis, v. 18, n. 1, p. 79-84, 1997.

PRATES, H.S.; NAKANO, O.; GRAVENA, S.A “Minadora das folhas de citros” *Phyllocnistis citrella*, Stainton, 1856. Campinas: CATI, 1996. 3p. (CATI. Comunicado Técnico, 129).

PRUVOST, O.; VERNIÈRE, C.; HARTUNG, J.; GOTTWALD, T.R.; QUETELARD, H. Towards an improvement of citrus canker control in Reunion island. **Fruits**, Paris, v. 52, p. 375-382, 1997.

RADKE S.G.; KANDALKAR, H.G. Bionomics of citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae). **PKV Research Journal**, Nagpur, v. 11, p.91-92, 1987.

RAGA, A.; CERAVOLO, L.C.; SOUZA FILHO, M.F.D.; MONTES, S.; ROSSI, A.C.; SATO, M.E.; SOUZA FILHO, M.F.E de. Efeitos de inseticidas sobre *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lep.: Gracillariidae) em laranja Pera (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 73, n. 1, p. 142-151, 1998.

RODRIGUES, J.C.V.; PRATES, H.S.; MATTOS JUNIOR, D.; MÜLLER, G.W.; CARVALHO, S.A. Controle químico da lagarta minadora dos citros em borbulheiras de laranja doce. **Laranja**, Corderópolis, v. 18, n. 1, p. 79-84, 1997.

ROELOFS, W.L. Eletroantennogram assays: rapid and convenient screening procedures for pheromones. In: HUMMEL, H.E; MILLER, T.A. (Ed.). **Techniques in pheromone research**, New York: Spring-Verlag, 1984. p. 131-159.

ROTHSCHILD, G.H.; MINKS, A.K. Time of activity of male oriental fruit moths at pheromone sources in field. **Environmental Entomology**, College Park, v. 3, n. 6, p. 1003-1007, 1974.

SÁ, L.A.N. de.; COSTA, V. A.; OLIVEIRA, W.P.D.; ALMEIDA, G.R. de; Survey of parasitoids of *Phyllocnistis citrella* in Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PESTS IN AGRICULTURE, 5., 1999, Montpellier. **Proceedings...** Montpellier: ANPP, 1999. p. 287-293.

SÁ, L.A.N. de; COSTA, V.A.; NARDO, E.A.B. de; ARELLANO, F.; FUINI, L.C. Parasitismo da larva minadora da folha dos citros, *Phyllocnistis citrella*, no município de Jaguariúna, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 17., 1998, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: SEB, 1998. p. 65.

SACARIAS, E. N.; CANALES, A.C. **Agéniaspis citricola controlador del minador de la hoja de los cítricos: experiencia Peruana**. Lima: Serviço Nacional de Sanidad Agraria, SENASA, 1999. 88 p.

SALLES, L.A.B.; MARINI, L.H. Avaliação de uma formulação de feromônio de confundimento no controle de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 18, p. 329-336, 1989.

SANT'ANA, J.; CORSEUIL, E.; CORREA, A.G.E.; VILELA, E.F. Avaliação da atração de *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera, Gracillariidae) a (Z,Z) e (Z,E)-7,11-hexadecadienal, em pomares de citros do Brasil. **Biociências**, Porto Alegre, v. 11, p. 77-181, 2003.

SCHNEIDER, D. Electrophysiological investigation on the antennal receptors of the silk moth during chemical and mechanical stimulation. **Experientia**, Basel, v. 13, p.89-91, 1957a.

SCHNEIDER, D. Electrophysiologische Untersuchungen von Chemo- und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. **Zeitschrift Fur Vergleichende Physiologie**, Berlin, v. 40, p. 8-41, 1957b.

SCHNEIDER, D. Electrophysiological investigation of insect olfaction. In: ZOTTERMAN, I.Y. (Ed.) **Olfaction and Taste**. Oxford: Pergamon Press, 1963. p. 85-103.

SCHNEIDER, D. Insect olfaction: Deciphering system for chemical messages. **Science**, Washington, v. 163, p. 1031-1037, 1969.

SCHWARTZ, N. N.; BLUMBERG, J. H. Epoxidations with m-chloroperbenzoic acid. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 29, p. 1976-1979, 1964.

SILVEIRA-NETO, S.; PRECETTI, A.A.C.M.; BRAZ, A.J.B.P.; SANTOS, P.E.T.. Flutuação populacional de *Grapholita molesta* (Busck) (Lep., Olethreutidae) em pessegueiro e nectarina, com o uso de feromônio sexual sintético. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 10, p. 43-49, 1981.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. New York: Wiley, 1981. 442 p.

SINGH, B.P. Studies on the bionomics and control of citrus leaf miner *Phyllocnistis citrella* Stainton. **Pesticides**, Bombay, v. 18, p. 46-50, 1984.

SMITH, J.M.; HOY, M.A. Rearing methods for *Ageniaspis citricola* (Hymenoptera: Encyrtidae) and *Cirrospilus quadristriatus* (Hymenoptera: Eulophidae) released in a classical biological control program for the citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 78, n. 4, p. 601-608, 1995.

SUBBA RAO., B.R.; RAMAMANI, S. Biology of *Cirrospiloides phyllocnistoides* (Narayanan) and description of a new species, *Scotolinx quadristriata* (Hymenoptera: Eulophidae) as parasites of *Phyllocnistis citrella* Stainton. **Indian Journal of Entomology**, New Delhi, v. 27, p. 408-413, 1965.

STANTON, T.H. Descriptions of three species of Indian microlepidoptera. **Transactions of the Royal Entomological Society of London**, London, v. 3, p. 301-304, 1856.  
STENHAGEN, E.; ABRAHAMSSON, S.; McLAFFERTY, F.W. **Registry of mass spectral data**. New York: Wiley, 1974. 3358p.



STÄLBERG-STENHAGEN, S. Studies on natural odoriferous compounds. V. Splitter-free all glass intake system for glass capillary gas chromatography of volatile compounds from biological material. **Chemica Scripta**, Stockholm, v. 2, p. 97-100, 1972.

STRUBLE, D.L.; RICHARDS, K.W. Identification of sex pheromone components of the female driedfruit moth, *Vitula edmandsae serratilineella*, and a blend for attraction of male moths. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 9, p. 785-801, 1983.

STRUBLE, D.L.; HEINRICH, A. Combined gas chromatography and eletroantennogram recording of insect olfactory responses. In: HUMMEL, H.E.; MILLER, T.A. (Ed.) **Techniques in pheromone research**. New York: Springer-Verlag, 1984. p.161-178.

STRUBLE, D.L.; BUSER, H.R.; ARN, H.; SWAILES, G.E. Identification of sex pheromone components of redbacked cutworm, *Euxoa ochrogaster*, and modification of sex attractant blend for adult males. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 6, p. 573-584, 1980.

SVATOS, A.; ATTYGALLE, A.B.; JHAM, G.N.; FRIGHETTO, R.T.S.; VILELA, E.F.; SAMAN, D.; MEINWALD, J. Sex pheromone of tomato pest *Scrobipalpuloides absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 2, p. 787-800, 1996.

TERAN, F.O.; KASTER JUNIOR, P.; HENRIQUE, B.C.; VITO, F.D. Melhorias na captura maciça de machos da broca em armadilhas de feromônio natural. **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, v. 32, p. 42-51, 1985.

TERAN, F.O.; REZENDE, L.C.L. Tentativas de controle da broca com feromônio na Usina São João. **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, v. 37, p. 19-26, 1987.

TILLMAN, J.A.; SEYBOLD, S.J.; JURENKA, R.A.; BLOMQUIST, G.J. Insect pheromones – an overview of biosynthesis and endocrine regulation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 29, p. 481-514, 1999.

TUMLINSON, J.H.; HEATH, R.R. Structure elucidation of insect pheromones by microanalytical methods. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 2, p. 87-99, 1976.

UJIYE, T. Parasitoid complex of the citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Phyllocnistidae) in several citrus-growing districts of Japan. **Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu**, Kagoshima, v. 34, p. 180-183, 1988.

UJIYE, T. Studies on the utilization of a sex attractant of the citrus leafminer moth, *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Phyllocnistidae). 1. Analysis of seasonal populations trends and some behavioural characteristics of the male moth by the use of synthetic Sex attractants in the field. **Bulletin of the Tree Research Station**, Ibaraki, v. 18, p. 19-46, 1990.

UNELIUS, C.R.; EIRAS, A.; WITZGALL, P.; BENGTSSON, M.; KOVALESKI, A.; VILELA, E.F.; BORG-KARLSON, A.K. Identification and synthesis of the sex pheromones of *Phtheochroa cranaodes* (Lepidoptera: Tortricidae). **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 37, p. 1505-1508, 1996.

VICK, K.W.; SU, H.C.F.; SOWER, L.L.; MAHANY, O.G.; DRUMMOND, P.C. (Z-E)-7,11-Hexadecadien-1-ol acetate-Sex-pheromone of angoumois grain moth, *Sitotroga cerealella*, **Experientia**, Basel, v. 30, n. 1, p. 17-18, 1974.

VILELA, E.F. Aplicação da biotecnologia no controle de pragas. **Biotecnologia**, Piracicaba, v. 19. p. 4, 1988.

VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.). **Feromônios de Insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas**. Ribeirão Preto: Holos, 1987. 155 p.

VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. Introdução aos semioquímicos e terminologia. In: \_\_\_\_\_. **Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 9-12.

VINCENTI, M.; GUGLIELMETTI, G.; CASSANI, G.; TONINI, C. Determination of double bond position in diunsaturated compounds by mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 59, p. 694-699, 1987.

ZARBIN, P.H.G. Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos. In: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed). **Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 45-50.

ZHANG, Z.; YANG, M.J.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 66, p. 844-853, 1994.

WEATHERSTON, J.; MACLEAN, W. The occurrence of (E)-11-tetradecen-1-ol, a known sex attractant inhibitor, in the abdominal tips of virgin female eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). **Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 106, p. 281-284, 1974.

WILSON, C.G. Notes on *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Phyllocnistidae) attacking four citrus varieties in Darwin. **Journal of the Australian Entomological Society**, Brisbane, v. 30, p. 77-78, 1991.

WITZGALL, P.; LINDBLOM, T.; BENGTSSON, M.; TÓTH, M. **The Pherolist**. Disponível em : <[www-pherolist.slu.se](http://www-pherolist.slu.se)>. Acesso em: 1 out. 2005.

YAMAMOTO, P. T., ROBERTO, S. R., PIRA JUNIOR W.D. Inseticidas sistêmicos aplicados via tronco para controle de *Oncometopia facialis*, *Phyllocnistis citrella* e *Toxoptera citricida* em citros. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 415-420, 2000.

YANG, X.; PEPPARD, T. Solid phase microextraction of flavor compounds – a comparison of two fiber coatings and discussion of the rules of thumb for adsorption. **L.C.-G.C.**, Cleveland, v. 13, p. 882-886, 1995.

YEN, Y. P. CHANG, C. Y. Synthesis of the Sex Attractant (7z,11z)-Hexadecadienal of the Citrus Leafminer Moth, *Phyllocnistis citrella* Stainton. **Journal of the Chinese Chemical Society**, Taipei, v. 38, n. 1, p. 293-295, 1991.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)