

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL**



**ESTUDO DA ECOLOGIA QUÍMICA DA BROCA-DO-FRUTO DO
CUPUAÇUZEIRO *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera:
Curculionidae): PROSPECÇÃO DE SEMIOQUÍMICOS E ESTUDOS
COMPORTAMENTAIS**

EDINALDO LOPES DA COSTA

MANAUS

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL**

EDINALDO LOPES DA COSTA

**ESTUDO DA ECOLOGIA QUÍMICA DA BROCA-DO-FRUTO DO CUPUAÇUZEIRO
Conotrachelus humeropictus Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae): PROSPECÇÃO DE
SEMIOQUÍMICOS E ESTUDOS COMPORTAMENTAIS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia Tropical, na Área de Produção vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Neliton Marques da Silva

Co-Orientadora: Dra. Maria Carolina Blassioli-Moraes

MANAUS

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C837e Costa, Edinaldo Lopes
ESTUDO DA ECOLOGIA QUÍMICA DA BROCA-DO-FRUTO DO CUPUAÇUZEIRO *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) : Prospecção de semioquímicos e estudos comportamentais / Edinaldo Lopes Costa. 2018
134 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Neliton Marques da Silva
Coorientadora: Maria Carolina Blassioli-Moraes
Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas.

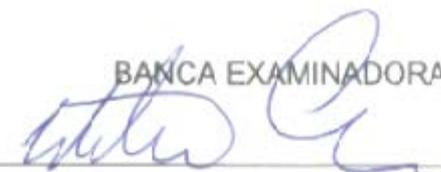
1. Broca-do-cupuaçu. 2. Semioquímicos. 3. Controle de pragas. 4. Estudos comportamentais. I. Silva, Neliton Marques da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

EDINALDO LOPES DA COSTA

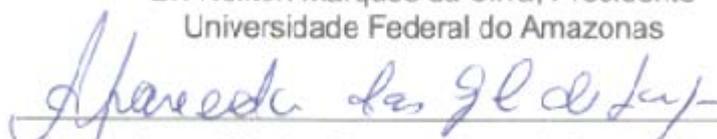
**ESTUDO DA ECOLOGIA QUÍMICA DA BROCA-DO-FRUTO DO CUPUAÇUZEIRO
Conotrachelus humeropictus Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae):
PROSPECÇÃO DE SEMIOQUÍMICOS E ESTUDOS COMPORTAMENTAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia Tropical, área de concentração Produção vegetal.

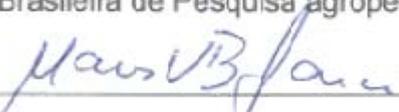
BANCA EXAMINADORA



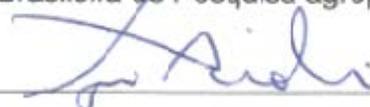
Dr. Neliton Marques da Silva, Presidente
Universidade Federal do Amazonas



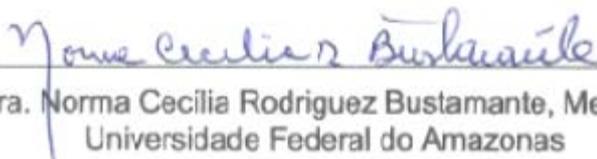
Dra. Aparecida das Graças Claret de Souza, Membro
Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária – EMBRAPA



Dr. Marcos Vinícius Bastos Garcia, Membro
Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária – EMBRAPA



Dr. Agno Nonato Serrão Acioli, Membro
Universidade Federal do Amazonas



Dra. Norma Cecilia Rodriguez Bustamante, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Manaus, 17 de janeiro de 2018

Dedico a minha família, pelo incentivo e apoio sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de luz e confiança em minha caminhada.

Aos meus pais, Edno Soares da Costa e Maria de Nazaré Lopes da Costa, por representarem minha fonte de segurança e amor;

À minha família (irmãos, irmãs, cunhados, sobrinhos, tios e avós), pelo amor e por sempre acreditarem no meu sucesso profissional;

À minha Esposa, Adrielle Ribeiro Costa, minha filha Sophia Ribeiro Costa e meu filho Levi Ribeiro Costa pela inspiração e amor.

À Universidade Federal do Amazonas e Faculdade de Ciências Agrárias pela minha formação e oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação em Agronomia Tropical;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão de bolsa de estudos durante o curso;

A Secretaria Municipal de Educação do município de Manaus (SEMED) pela liberação para realizar curso de Pós-Graduação por meio do PROGRAMA QUALIFICA e propiciar ao servidor uma política de qualificação condizente, de valorização.

A Secretaria de Estado de Educação e Qualidade de Ensino do Amazonas - SEDUC pelo apoio e acompanhamento durante o curso.

À Embrapa Amazônia Ocidental, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio logístico e financeiro necessários para a conclusão deste trabalho;

Aos Doutores, Neliton Marques da Silva e Carolina Moraes Blassioli, pela orientação, aprendizado e oportunidade de conviver com exemplos de profissionais dedicados, grandes detentor de conhecimentos na área de Entomologia e Ecologia Química. Meus sinceros agradecimentos e profunda admiração;

À Dra. Aparecida das Graças Claret de Souza por ser a responsável pela minha participação nessa linha de pesquisa tão importante dentro do projeto pesquisa: Pesquisas e inovações tecnológicas para o desenvolvimento da cultura do cupuaçuzeiro no Estado do Amazonas – Edital PRÓ-ESTADO/FAPEAM.

Aos Doutores, Miguel Borges, Raúl Laumann, Flávia Batista Gomes, Márcio Wandré, Ronaldo Ribeiro de Moraes e Ana Maria Santa Rosa Pamplona pelas valiosas sugestões para o aperfeiçoamento do trabalho;

Aos servidores da Embrapa Amazônia Ocidental, em especial ao Senhor Manoel Alvino Santos Andrade, Alarico de Souza Garcia, Joaquim Valdomiro Pinheiro Seabra, Sergio de Araújo Silva e a todos que participaram de etapas da pesquisa, pela ajuda.

Aos amigos Jakson Douglas, Paulo Correa e Wanderley Guimarães pela ajuda nas coletas e instalação de experimentos.

Ao inesquecível grupo de estudos de Pós-graduação, Jakson Douglas, Marcelo Tavares, Rodrigo Rener, Fabiana Rocha, Suelen Lima, Francisco Martins, pela amizade e momentos de descontração.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e para que eu pudesse dar mais esse passo em busca do meu objetivo profissional, meu muito obrigado.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
OBJETIVOS.....	xiii
Geral.....	xiii
Específicos	xiii
HIPÓTESES	xiv
RESUMO	xv
SUMMARY	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	17
O uso de semioquímicos no controle da broca-do-cupuaçu (<i>Conotrachelus humeropictus</i>)	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1. A espécie [<i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd ex Spreng) Schum]	20
2.1.1. Características gerais.....	20
2.1.2. Importância socioeconômica do cupuaçuzeiro.....	21
2.1.3. Ocorrência e distribuição	21
2.1.4. Aspectos botânicos.....	23
2.1.5. Compostos orgânicos voláteis do cupuaçuzeiro em interação inseto-planta	24
2.2. A espécie <i>Conotrachelus humeropictus</i> Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae).....	26
2.2.1. Descrição taxonômica	26
2.2.1. Danos e importância econômica.....	28
2.2.2. Biologia.....	29
2.2.3. Atividades comportamentais	31
2.2.4. Manejo e controle.....	33
2.2.5. Semioquímicos no manejo de <i>Conotrachelus humeropictus</i>	36
2.3. Semioquímicos.....	38
2.3.1. Semioquímicos e interações ecológicas	38
2.3.2. Semioquímicos e o manejo de insetos-pragas	39
2.3.3. Cairomônios em insetos-pragas.....	42
3. CAPÍTULO I: Avaliação da influência dos voláteis de diferentes estruturas (flor, fruto e folha) do cupuaçuzeiro sobre o comportamento de busca de <i>Conotrachelus humeropictus</i> Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae).....	45
RESUMO	45
SUMMARY	46
3.1 INTRODUÇÃO.....	47
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.2.1. Local	50
3.2.2. Obtenção das formas imaturas e adultos	50
3.2.3. Período fenológicos do cupuaçuzeiro.....	52
3.2.4. Coleta de voláteis	52
3.2.5. Análises químicas dos compostos orgânicos voláteis do cupuaçuzeiro	53
3.2.6. Avaliação da atividade biológica dos voláteis do cupuaçuzeiro no comportamento de busca de <i>C. humeropictus</i>	54
3.2.7. Análises estatísticas.....	56
3.3. Resultados e discussão	57
3.3.1 Análise química dos compostos orgânicos voláteis	57
3.3.2. Bioensaios com adultos de <i>C. humeropictus</i>	62
3.2. CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66

4. CAPÍTULO II: Extração e identificação do feromônio de agregação de <i>Conotrachelus humeropictus</i> Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) oriundos de pomares de cupuaçu no Estado do Amazonas.	72
RESUMO	72
SUMMARY	73
4.1. INTRODUÇÃO.....	74
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	75
4.2.1. Obtenção da Criação Estoque	75
4.2.2. Coleta de voláteis de <i>C. humeropictus</i>	77
4.2.3. Análises químicas	78
4.2.4. Produção do feromônio por <i>C. humeropictus</i>	79
4.2.5. Configuração absoluta do ácido grandisoico produzido por <i>C. humeropictus</i>	80
4.2.6. Bioensaios em olfatômetro.....	80
4.2.6.1. Status fisiológicos dos insetos testados.....	80
4.2.7. Eletroantografia (EAG) para <i>C. humeropictus</i>	83
4.2.8. Teste de campo.....	84
4.2.9. Análises estatísticas.....	85
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
4.3.1. Identificação dos compostos macho-específicos de <i>Conotrachelus humeropictus</i>	86
4.3.3. Quantificação do composto ácido grandisoico.....	92
4.3.4. Avaliação da atividade biológica de <i>C. humeropictus</i> mediante os compostos sintetizados.....	93
4.3.5. Bioensaios com olfatômetros em Y	93
4.3.6. Eletroantografia (EAG) de <i>C. humeropictus</i>	98
4.3.7. Teste de atratividade em campo	99
4.2. CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS	102
5. CAPÍTULO III: Avaliação do nível e intensidade de infestação natural de <i>Conotrachelus humeropictus</i> Fiedler (Coleoptera: Curculionidae) em pomar de cupuaçuzeiro.	108
RESUMO	108
SUMMARY	109
5.1. INTRODUÇÃO.....	110
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	111
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	112
5.2. CONCLUSÕES	118
REFERÊNCIAS	119
CONCLUSÕES GERAIS	122
REFERÊNCIAS	123

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Compostos orgânicos voláteis coletados de plantas de cupuaçuzeiro em diferentes fenofases (média + erro padrão da média em µg no intervalo de 24h).	59
Tabela 3. 1 Número total de frutos infestados, número total de insetos adultos coletados no sacolejo, média de larvas de <i>Conotrachelus humeropictus</i> e de orifícios de saída de larvas por fruto de cupuaçu, em área experimental da Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus, AM. 2017	113
Tabela 3. 2 Número total de frutos avaliados, número de frutos broqueados, porcentagem média de frutos de cupuaçu atacados e número total de adultos de <i>Conotrachelus humeropictus</i> coletados pelo sacolejo em área experimental da Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus, AM. 2017.	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1 Área experimental utilizada para coleta de insetos e voláteis de plantas de cupuaçu.....	51
Figura 1. 2 A - Sistema de aeração de plantas utilizado para coleta de voláteis no campo.	53
Figura 1. 3 Diagrama do sistema de bioensaios em olfatômetro em “Y”.	55
Figura 1. 4 Compostos orgânicos voláteis totais (média + EP) liberados por plantas de cupuaçuzeiro nas fenofases de mudança foliar, floração e de frutificação.	58
Figura 1. 5 Perfis cromatográficos de plantas de cupuaçuzeiro nas fenofases de mudança foliar (M. foliar), floração e frutificação.	58
Figura 1. 6 Análise de Variáveis Canônicas (AVC) indicando a composição dos voláteis de plantas de cupuaçuzeiro em diferentes fenofases.	62
Figura 1. 7 Resposta da primeira escolha de machos e fêmeas adultos do campo de <i>Conotrachelus humeropictus</i> para extratos de aeração (24h) de cupuaçuzeiro em três fenofases (mudança foliar, floração e frutificação) no olfatômetro em “Y”.	64
Figura 2. 1 Área experimental utilizada para coleta de insetos e voláteis de plantas de cupuaçu.....	76
Figura 2. 2 Vista inferior do abdome de macho e fêmea de <i>C. humeropictus</i> . Separação dos sexos com base em observação da região esternal do último segmento abdominal.	77
Figura 2. 3 Sistema de aeração para coleta de voláteis de machos e fêmeas de <i>C. humeropictus</i> separados, juntamente com cana-de-açúcar como fonte alimentar.	78
Figura 2. 4 Diagrama do sistema de bioensaios em olfatômetro em “Y”.	82
Figura 2. 5 Olfatômetro em “Y” adaptado, vidraria anti-splash.	83
Figura 2. 6 Armadilhas utilizadas para captura dos insetos campo.....	85
Figura 2. 7 Área experimental da Embrapa Amazônia Ocidental. Esquema de distribuição das armadilhas.....	85
Figura 2. 8 Perfil cromatográficos do extrato de aeração obtidos na análise de CG-DIC com injetor splitless.	88
Figura 2. 9 Estrutura química dos três compostos identificados no extrato de aeração de machos de <i>C. humeropictus</i>	88
Figura 2. 10 Espectro de massas dos três compostos específicos dos machos. A. grandlure I, B grandlure II e C ácido grandisoico.	89
Figura 2. 11 Perfil de cromatograficos do extrato de aeração de <i>C. humeripictus</i> obtidos usando uma entrada de coluna fresca a 40oC.	90

Figura 2. 12 Análise em CG-quiral do A) ácido grandisoico, B) extrato de aeração de 55 machos de <i>C. humeropictus</i> , C) co-injeção do ácido grandisoico com o extrato de aeração de 55 machos.	92
Figura 2. 13 Emissão média do composto ácido grandisoico por machos de <i>C. humeropictus</i> , durante a escotofase e fotofase ($F_{2,12} = 4,425$, $p = 0,03088$).	93
Figura 2. 14 Primeira escolha de machos e fêmeas de <i>C. humeropictus</i> procedentes da coleção estoque e campo para odor e extratos de insetos vivos em bioensaios com olfatômetro em Y.	94
Figura 2. 15 Primeira escolha de machos e fêmeas de <i>Conotrachelus humeropictus</i> procedentes da coleção estoque e campo para solução sintética (ácido grandisoico (Sol.AG), Grandisolactona (Sol. Glactona) e Grandisol (Sol.GSOL) - 0,01 mg.ml), ácido grandisoico septo (AG-septo - 2 mg/septo) em bioensaios com olfatômetro em Y manufatura acrílico.....	97
Figura 2. 16 Primeira escolha de machos e fêmeas de <i>Conotrachelus humeropictus</i> procedentes do campo para ácido grandisoico (AG) - 2 mg/septo em bioensaios com olfatômetro em Y adaptado com de vidraria anti-splash.	98
Figura 2. 17 Resposta de uma antena de fêmeas de <i>C. humeropictus</i> à solução sintética de 0.01 mg/mL de ácido grandisoico. Análise por CG-EAD.	99
Figura 3. 1 Área experimental utilizada para coleta de insetos e voláteis de plantas de cupuaçu.....	112
Figura 3. 2 Número total de machos e fêmeas adultos de <i>C. humeropictus</i> coletados no período de janeiro a dezembro de 2017, amostradas pelo método do sacolejo, em 30 cupuaçuzeiros componentes de um monocultivo, com e sem mata ao redor. Manaus, AM.....	115
Figura 3.3 Precipitação pluviométrica e temperatura médias observadas na Estação Agroclimatológica Convencional da Embrapa Amazônia Ocidental - CPAA durante o ano de 2017. Manaus, AM.	115
Figura 3. 4 Levantamento e monitoramento de adultos de <i>Conotrachelus humeropictus</i> no período de janeiro a dezembro de 2017, amostradas pelo método do sacolejo, em 30 cupuaçuzeiros componentes de um monocultivo. Manaus, AM.....	116
Figura 3. 5 Levantamento e monitoramento físico de adultos de <i>Conotrachelus humeropictus</i> em plantas adjacentes a mata e dentro do pomar, no período de janeiro a dezembro de 2017, amostradas pelo método do sacolejo, em 30 cupuaçuzeiros componentes de um monocultivo. Manaus, AM.	117

OBJETIVOS

Geral

- Prospectar semioquímicos envolvidos no comportamento de *Conotrachelus humeropictus* (Coleoptera: Curculionidae) associados ao cupuaçuzeiro visando seu uso no manejo integrado de pragas (MIP)

Específicos

- Analisar o perfil químico de voláteis emitidos pelo cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) nas fenofases (floração, frutificação e mudança foliar);
- Avaliar por meio de bioensaios a atividade biológica dos voláteis emitidos pelo cupuaçuzeiro no comportamento de busca de *C. humeropictus*;
- Extrair, identificar e quantificar semioquímicos da broca do cupuaçu *C. humeropictus*;
- Avaliar a resposta comportamental de machos e fêmeas para os extratos contendo os compostos sexo-específico.
- Monitorar a população de *C. humeropictus* (inseto-alvo) no campo e avaliar o nível e intensidade de infestação natural de em pomar de cupuaçuzeiro afim de auxiliar estudos de ecologia química.

HIPÓTESES

- O cupuaçuzeiro apresenta diferenças no perfil de voláteis liberados por plantas e estes voláteis influenciam no comportamento de busca de *C. humeropictus*;
- *Conotrachelus humeropictus* discrimina cupuaçuzeiros na fenofase de mudança foliar daquela na floração por meio das diferenças no perfil de voláteis emitidos por plantas de diferentes fenofases.
- O recrutamento de novos indivíduos de *C. humeropictus* à cultura do cupuaçuzeiro é estimulado pelo sinergismo de “compostos químicos específicos” com voláteis emitidos por plantas de cupuaçuzeiro.
- O reconhecimento entre machos e fêmeas de *C. humeropictus* pode ser mediado por um feromônio sexo-específico.

**ESTUDO DA ECOLOGIA QUÍMICA DA BROCA-DO-FRUTO DO CUPUAÇUZEIRO
Conotrachelus humeropictus Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae): PROSPECÇÃO
DE SEMIOQUÍMICOS E ESTUDOS COMPORTAMENTAIS**

Autor: Edinaldo Lopes da Costa
Orientadores: Neliton Marques da Silva
Maria Carolina Blassioli Moraes

RESUMO

Esta tese teve por objetivo a prospecção de semioquímicos e estudos comportamentais de *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940, associados ao cupuaçuzeiro. Trabalhou-se na perspectiva de compreender a origem, função e o significado dos compostos químicos naturais que regulam as interações entre *C. humeropictus* e o cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum), neste caso, incluindo feromônios e aleloquímicos. Para isto, estudos com semioquímicos de insetos e plantas foram desenvolvidos em plantações de cupuaçuzeiro localizados nos campos experimentais da Embrapa Amazônia Ocidental, na região de Manaus-Amazonas entre os anos de 2015 e 2017. As análises químicas dos extratos de aeração do cupuaçuzeiro mostraram que há diferença na composição das misturas de voláteis liberadas nas fenofases (floração, frutificação e mudança foliar) consideradas. A classe de compostos liberadas nas diferentes fenofases foi similar sendo composto majoritariamente de monoterpenos, sesquiterpenos e alguns aromáticos. Machos adultos de *C. humeropictus* responderam preferencialmente aos odores liberados pelo cupuaçuzeiro na fenofase de frutificação. Machos produzem três compostos específicos que não estão presentes nos extratos de aeração de fêmeas, os compostos ácido grandisoico, grandlure I e grandlure II. Fêmeas respondem para o composto majoritário ácido grandisoico. O levantamento de insetos adultos no pomar constatou maior nível de infestação em plantas localizadas ao redor da mata, onde aproximadamente 91% dos insetos (% do total observado no pomar) estavam presentes. O nível de infestação durante a safra chegou a 42%, com média de quatro larvas por fruto. Adultos de *C. humeropictus* foram coletados em todos os meses do ano, com níveis mais baixos durante o período da safra. Os resultados sobre a atratividade do ácido grandisóico para fêmeas, respostas preferenciais dos machos aos odores liberados na frutificação, níveis de infestação no fruto e adultos na planta durante a safra tem implicações importantes ao uso de semioquímicos no manejo integrado da broca-do-cupuaçu.

Palavras chaves: Feromônio, broca-do-cupuaçu; compostos orgânicos voláteis, cupuaçu.

**STUDY OF THE CHEMICAL ECOLOGY OF CUPUASSU FRUIT BORER
CUPUASSU *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae):
PROSPECTION OF SEMIOCHEMICALS AND BEHAVIORAL STUDIES**

SUMMARY

This thesis had the objective the prospection of semiochemicals and behavioral studies of cupuassu fruit borer (*Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940). In this study, worked on perspective of understand, origin, function and meaning of the natural chemical compounds that regulate the interactions between *C. humeropictus* and the cupuassu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) Schum), in this case, including pheromones and allelochemicals. For this, studies with semiochemical of the insects and plants were developed in cupuassu plantations located in the experimental fields of Embrapa Western Amazonia, in the region of Manaus-Amazonas between the years of 2015 and 2017. The chemical analyzes of cupuassu aeration extracts showed that there is difference in the composition of the volatile mixtures released at the phenological stages considered. The class of compounds released in the different stages was similar being composed mainly of monoterpenes, sesquiterpenos and some aromatics. Adult males of *C. humeropictus* responded preferentially to odors released by the cupuassu in the phenological stages of fructification. The chemical analysis of aeration extracts of males and females showed that males produce three specific compounds that are not present in the aeration extracts of females, the compounds grandisoic acid, grandlure I and grandlure II. Male volatiles are attractive to females and females also respond to the grandiose acid majoritarian compound. The survey and monitoring of adults in the orchard used in this study found a higher level of insect infestation in plants located around the forest, where approximately 91% of adult insects were also present. The level of infestation during the harvest reached 42%, with an average of four borer per fruit. Adults of *C. humeropictus* were collected in all months of the year, with lower levels than during the harvest period. These results have important implications for the use of semiochemicals in the integrated pest management of cupuassu.

Key words: Pheromone, volatiles compounds, cupuassu fruit borer.

1. INTRODUÇÃO

O uso de semioquímicos no controle da broca-do-cupuaçu (*Conotrachelus humeropictus*)

Feromônios e outros semioquímicos são úteis para o manejo integrado de diversas pragas agrícolas. Caracterizam-se como tecnologias seguras, sustentáveis e são aplicados em milhares de hectares no mundo (WITZGALL et al., 2010; RIFFEL; SOBHY et al., 2014; COSTA, 2015). No Brasil o uso de semioquímicos vem aumentando a cada ano, mas não há números disponíveis sobre esse uso. Entretanto, no sul do país, há registros do uso de feromônio para o controle da mariposa *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) usando a técnica de confundimento sexual e da mariposa *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) usando a técnica de monitoramento (BOTTON et al., 2001; MONTEIRO et al., 2008).

Na Amazônia, assim como em outras regiões do país o uso de semioquímicos para o controle de pragas ainda é incipiente. Todavia, o uso de uma técnica de alta especificidade, que atua na espécie alvo e nenhum resíduo é depositado no meio ambiente ou no alimento produzido, condiz com o modelo de agricultura preconizado à essa região (FEARNSIDE, 1989).

Nesse sentido, a exploração e busca por novas moléculas químicas com aplicações à agricultura na Amazônia devem ser incentivadas. Considerando que a fruticultura como opção interessante para o desenvolvimento da agropecuária local, frutas nativas da Amazônia brasileira como o cupuaçu, merecem destaque para esse tipo de exploração.

Posteriormente ao açaí, o cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng. Schum.) é uma das frutíferas nativas de maior expressão econômica da Amazônia. A cultura do cupuaçuzeiro oferece algumas vantagens comparativas que, se bem exploradas, poderá torná-lo uma alternativa viável sob diferentes pontos de vista: social, econômico e ambiental (GONDIN et al., 2001; SOUZA, 2007; ALVES et al., 2014).

Atualmente, a produção de cupuaçu provém, basicamente, de plantios comerciais, estimados em mais de 20.000 ha, distribuídos no Pará, Amazonas, Rondônia e Acre, principalmente. No Estado do Amazonas quase todos os municípios (62, no total) possuem pequenas áreas produtivas com o cupuaçuzeiro, tornando-se, portanto, um dos produtos mais expressivos do Amazonas (ALVES et al., 2014).

Entre as estratégias para equacionar os entraves da cadeia produtiva do cupuaçuzeiro está o controle da broca-do-fruto (*Conotrachelus humeropictus*), praga de maior ocorrência

no cupuaçuzeiro das áreas de cultivo da Amazônia e que acarreta graves prejuízos econômicos aos plantios nos casos de ataque intenso (LOPES; SILVA, 1998; THOMAZINI, 2000).

Diversas são as recomendações preventivas que ainda prevalecem e fazem parte dos métodos de controle da broca-do-cupuaçu como, manter plantios afastados de florestas e lavouras de cacauzeiro; inspeções periódicas dos pomares; ensacamento de frutos, eliminação precoce de frutos atacados, entre outras. Por sua vez, a eficiência de inseticidas químicos no controle desta praga ainda não foi verificada em campo. A utilização de controle biológico, apesar de efetiva em testes laboratoriais, carece de mais informações em nível de campo (TEIXEIRA; GERALDA, 1997; GARCIA et al., 1997; SILVA; ALFAIA, 2004; SOUZA, 2007; TREVISAN et al., 2011).

Neste cenário, é consenso que novos estudos e tecnologias sejam desenvolvidos no âmbito do manejo integrado de pragas para mitigar os prejuízos causados pela broca-do-cupuaçu. Em especial, que promova o desenvolvimento da cultura numa visão agrosustentável.

Deste modo, a Ecologia Química, a qual estuda a interação química entre inseto-inseto, planta-planta, patógeno-patógeno; planta-patógeno, planta-inseto e animal-inseto-patógeno, pode oferecer excelente oportunidade para incrementar a pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias para o controle de pragas, possibilitando a descoberta de novas estruturas, as quais poderão originar produtos mais específicos e menos prejudiciais ao ambiente e à vida, do que agrotóxicos em uso na atual agricultura (BORGES et al., 2015; GOULART et al., 2015).

O grande potencial econômico, fitossanitário e ambiental da Ecologia Química justifica sua aplicação às culturas Amazônicas, neste caso, o cupuaçu. Portanto, prospectar semioquímicos da broca-do-cupuaçu bem como, os voláteis emitidos pelo cupuaçuzeiro e a sua influência sobre o comportamento da broca podem ser essenciais para produzir ferramentas eficientes no manejo da praga (BORGES et al., 2015).

Esta tese é resultado de um trabalho sobre a ecologia química da broca-do-cupuaçu (*Conotrachelus humeropictus*). Inserido no projeto de pesquisa: Pesquisas e inovações tecnológicas para o desenvolvimento da cultura do cupuaçuzeiro no Estado do Amazonas – Edital PRÓ-ESTADO. Financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM.

A partir do tema delimitado e da problematização da pesquisa que resultou nesta tese, o objetivo geral foi definido como: prospectar semioquímicos envolvidos no comportamento de *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) associados ao cupuaçuzeiro visando seu uso no manejo integrado de pragas (MIP). E, como objetivos específicos: analisar o perfil químico de voláteis emitidos pelo cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) nas fenofases (floração, frutificação e mudança foliar); avaliar por meio de bioensaios a atividade biológica dos voláteis emitidos pelo cupuaçuzeiro no comportamento de busca de *C. humeropictus*; extrair, identificar e quantificar semioquímicos da broca do cupuaçu *C. humeropictus*; avaliar a resposta comportamental de machos e fêmeas para os extratos contendo os compostos sexo-específico; Monitorar a população de *C. humeropictus* (inseto-alvo) no campo e avaliar o nível e intensidade de infestação natural em pomar de cupuaçuzeiro afim de auxiliar estudos de ecologia química.

A tese está estruturada em três capítulos. No primeiro capítulo, é avaliada a influência dos voláteis de diferentes estruturas (flor, fruto e folha) do cupuaçuzeiro sobre o comportamento de busca de *C. humeropictus*. Para isto, foram conduzidas coletas de voláteis de 20 plantas de cupuaçu e a influência desses voláteis sobre o comportamento de busca de *C. humeropictus* pela planta hospedeira avaliada em bioensaios comportamentais em laboratório.

No segundo capítulo, é descrito os estudos conduzidos para identificar feromônio de agregação do *C. humeropictus* e avaliar o potencial desse feromônio para o manejo e/ou controle de *C. humeropictus* em pomares de cupuaçu. Para isto, conduziu-se coletas de voláteis de machos e fêmeas e análises em cromatografia gasosa com detector por ionização de chama e espectrometria de massas dos extratos de aeração obtidos de machos e fêmeas, possibilitando estudar e elucidar a estrutura química de três componentes com grande potencial de feromônio de agregação da broca-do-fruto do cupuaçu.

No terceiro capítulo são avaliados o nível e intensidade de infestação natural de *C. humeropictus* no período da safra do cupuaçuzeiro e analisado a dinâmica desta infestação no pomar desta frutífera. Com estas informações são discutidas as possíveis formas de manejo e controle desta praga.

Por fim, nas considerações finais apresento as principais conclusões deste estudo e as implicações para futuras pesquisas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A espécie [*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum]

2.1.1. Características gerais

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum) (Malvaceae), é uma fruteira arbórea nativa da Amazônia brasileira (CALZAVARA et al., 1984; CAVALCANTE, 2010) (Figura 1). Apresenta excelente potencial agroindustrial e está no *ranking* das exportações de frutas Amazônicas (SOUZA, et al., 1999; SANTOS et al., 2010).

Souza et al. (2011) destacam que os produtos dessa fruta, designada fruta nacional pela Lei nº 11.675, de 19 de maio de 2008, tem boa aceitação e conquista fatia de mercado cada vez maior entre as frutas tropicais, tendo como consequência a expansão do cultivo na região Norte. A polpa é utilizada em grande escala na agroindústria de néctares, sucos, sorvetes, doces e sobremesas. As amêndoas na elaboração de produtos similares aos que são obtidos do cacau (*Theobroma cacao* L.) e a casca como adubo e na confecção de artesanatos (NAZARÉ et al., 1990; SOUZA et al., 2011).

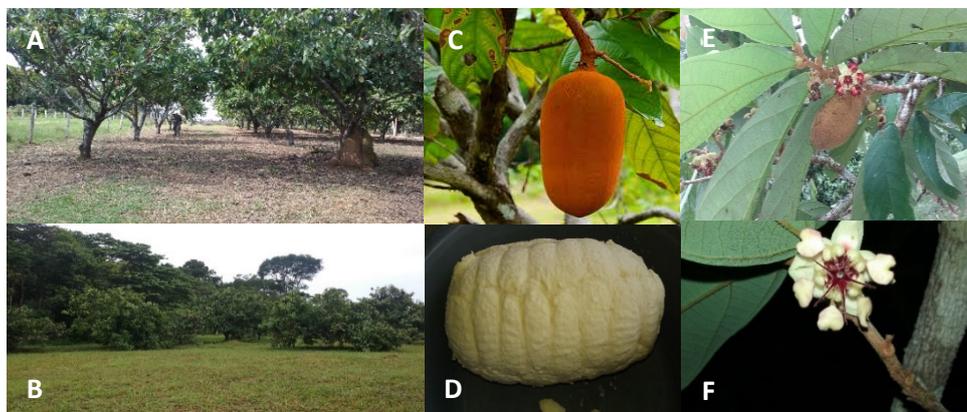


Figura 1. Aspectos da produção de frutos do cupuaçuzeiro (A e B) pomar com plantas em produção; (C) fruto maduro; (D) fruto maduro sem casca; (E) ramo com botões, flores e frutos; (F) flor totalmente aberta.

2.1.2. Importância socioeconômica do cupuaçuzeiro

Durante as três últimas décadas, a cultura do cupuaçu destaca-se como importante alternativa econômica para pequenos e médios produtores rurais na Amazônia (VENTURIERI, et al., 1985; MULLER; CARVALHO, 1997; ALMUDI, 2015). O cultivo é realizado em pequenas propriedades rurais e emprega basicamente mão-de-obra familiar (ROCHA NETO et al., 1999; ALVES et al., 2014).

Segundo Alves et al. (2014) até a década de 1970 toda a produção de cupuaçu era oriunda do extrativismo. Atualmente provém, basicamente, de plantios comerciais, estimados em mais de 20.000 ha, distribuídos no Pará, Amazonas, Rondônia e Acre.

No Amazonas, o cupuaçu ocupa a quarta posição em área plantada das lavouras permanentes (5.536 ha), 85% dessa área está em produção (4.657 ha) e nas culturas de lavoura permanente está entre as dez com melhor preço médio ao produtor. Compõe lista de produtos cuja produção é relevante em âmbito regional, ao lado do açaí (*Euterpe oleracea*), pupunha (*Bactris gasipaes*) e graviola (*Annona muricata*) (ALMUDI; PINHEIRO, 2015).

No agronegócio da fruticultura há grande oportunidade para o setor de polpa de frutas tropicais não convencionais. Segundo Souza (2007) o cupuaçu está entre estas frutas, atendendo às necessidades de vários segmentos da indústria de produtos alimentícios. Do ponto de vista nutricional, o cupuaçu é um fruto com enorme potencial pelas múltiplas utilidades de sua polpa e amêndoa, sendo relativamente superior à maioria das outras fruteiras amazônicas (BARBOSA et al., 1978; CHAAR, 1980; RIBEIRO et al., 1992)

Vale destacar que o cultivo do cupuaçuzeiro consorciado com outras espécies em sistemas agroflorestais, como o açaizeiro, determina benefícios de ordem ambiental, econômica e social, promovendo a diversificação da renda para pequenos agricultores (SOUZA; SOUZA, 1999; CASTRO et al., 2009; ALVES et al., 2014;).

2.1.3. Ocorrência e distribuição

É uma árvore nativa da floresta amazônica tropical úmida de terra firme e de várzea alta (CUATRECASAS, 1964; CALZAVARA 1970). Segundo Ducke (1953) originalmente a distribuição geográfica do cupuaçuzeiro era restrita às áreas de florestas nativas ao sul do rio Amazonas, oeste do rio Tapajós, sul e sudeste do estado do Pará e a região “pré-amazônica”

do estado do Maranhão. Esta região foi considerada como o centro de origem da espécie por Cuatrecasas (1964).

De acordo com Alves (2002) a diversidade genética observada entre as populações coletadas no Sul e Sudeste do Pará e Noroeste do Maranhão, dá respaldo à hipótese que aponta a região como o centro de máxima diversidade do cupuaçuzeiro (ALVES, 2002). Para Clement (1999) e Cavalcante (2010) trata-se de uma espécie pré-colombiana que, provavelmente, foi disseminada, do seu centro de origem, para todos os estados da região Norte, através da intensa movimentação das nações indígenas no interior da Amazônia.

No Brasil, o cupuaçuzeiro está disseminado por todo o Pará, bacia Amazônica, Amazonas, Acre, Rondônia, norte do Maranhão, São Paulo, Espírito Santo, Paraná, Jardim Botânico do Rio de Janeiro e Bahia. Há registros que essa fruteira em vários estados brasileiros e outros países como Colômbia, Peru, Bolívia, Guiana, Martinica, Equador, São Tomé, Trinidad, Gana e Costa Rica (DUCKE, 1940; CALZAVARA et al., 1984; VENTURIERI; AGUIAR, 1988).

Alves et al. (2014) asseguram que as populações nativas de cupuaçuzeiro sofreram séria erosão genética nos últimos anos, pois suas áreas de ocorrência, especialmente no Sudeste paraense, foram ocupadas por grandes projetos pecuários. Segundo os autores, até áreas teoricamente mais protegidas, como o Polígono dos Castanhais, próximo à Marabá, foram drasticamente afetadas, e hoje restaram apenas alguns mosqueados da mata original, localizadas em reservas legais e áreas indígenas.

Há de se concordar com os autores quando categoricamente alertam sobre a importância dessas populações para a sustentabilidade biológica do cupuaçuzeiro. Em tese, são as únicas reservas de genes e genótipos do mundo que o melhoramento genético da cultura poderá lançar mão, na busca de materiais resistentes a uma nova praga ou doença futura. Bem como, será lá que serão buscados os genes que poderão melhorar a produtividade do cupuaçuzeiro.

2.1.4. Aspectos botânicos

O gênero *Theobroma*, contém 22 espécies e é considerado um grupo tipicamente neotropical (CUATRECASAS, 1964).

O cupuaçuzeiro que pertencia a família Sterculiaceae, atualmente está classificado na família Malvaceae (ALVERSON et al., 1999). A espécie é diploide e apresenta $2n = 20$ cromossomos (CARLETTO, 1946). Porém, o cupuaçuzeiro sem sementes (mamaú) coletado no município de Cametá, Estado do Pará, é triploide com 30 cromossomos, possivelmente decorrente de mutação natural (MORAES et al., 1994).

No ambiente silvestre, normalmente, compõem o extrato intermediário, chegando a atingir o dossel superior, com mais de 20 m de altura e 45 cm de diâmetro. Em cultivos, o porte do cupuaçuzeiro varia de 6 a 8 m e área de copa de 7 m de diâmetro (VENTURIERE, 1993).

Normalmente a copa é de formato variável, irregular e pouco espessa, com tronco de coloração acinzentada com manchas brancas. As folhas são simples, alternas, curto pecioladas, com lâmina verde na face superior e ferrugíneo-tomentosa na face inferior. As inflorescências são axilares ou ramifloras. As flores são hermafroditas de coloração que varia do branco ao vermelho-violeta. O fruto é uma baga oblonga, elipsoide ou oboval, que cai da árvore quando maduro, após quatro a quatro meses e meio desde a polinização (PRANCE; SILVA, 1975; CALZAVARA et al., 1984; VENTURIERI, 1993; CAVALCANTE, 2010).

O fruto apresenta o epicarpo lenhoso recoberto de pelos ferrugíneos que, quando raspado expõe uma camada clorofilada. O mesocarpo é esponjoso e pouco resistente. O endocarpo (parte comestível) tem coloração branco-amarelada, de sabor ácido odor agradável, e recobre as sementes. Estas apresentam-se em número variável de 15 a 50, em média 36 por frutos, são quase circulares, achatadas, medem aproximadamente 2,6 cm de comprimento por 2,3 cm de largura e 0,9 cm de espessura, superpostas em torno de um eixo central longitudinalmente disposto em relação ao comprimento do fruto e representam 16% do fruto (BARBOSA et al., 1978; VENTURIERI; AGUIAR, 1998).

O cupuaçuzeiro é tido como uma espécie alógama, auto incompatível, floresce no período mais seco do ano, (normalmente de julho a outubro no Amazonas) sendo que o pico de frutificação acontece no período das chuvas (janeiro a junho) (PRANCE; SILVA, 1975; VENTURIERI, 1994). É uma fruteira precoce, com produção bastante irregular e grande

variação entre plantas, muito afetada pelas condições ambientais e baixa fecundidade (FALCÃO; LLERAS, 1983).

A produção média de cupuaçuzeiros nativos é de 25 frutos/pé (HOMMA et al., 2001). Em condições de cultivo a variação de produção entre plantas é bastante pronunciada, devido a desuniformidade do material de plantações, além de variações das condições de clima e de cultivo (CALZAVARA, et al., 1984). Frutos maduros são facilmente reconhecidos em razão do cheiro agradável que exalam (SOUZA, et al., 1996). Estudos sobre os aspectos biofísicos de cupuaçuzeiro em viveiro, mostraram que as plantas de cupuaçu podem apresentar comportamento variável quanto a resposta fotossintética, nos vários estádios de desenvolvimento da planta na fase juvenil. Na fase adulta, as funções fotossintéticas também podem variar com o momento fenológico da planta (FIGUEIRÊDO et al., 2002).

As plantas de cupuaçu cultivadas ao sol têm maior atividade fotossintética líquida que as mantidas à sombra, independentemente da idade de um ou dois anos de cultivo. A taxa fotossintética líquida é influenciada positivamente pela maior disponibilidade de água no solo, como ocorre nos meses de janeiro a maio (FIGUEIRÊDO et al., 2005).

Muller et al. (1996), relata que quando submetidos a déficit hídrico, o cupuaçuzeiro apresenta paralisação no crescimento; perdas de folhas; secamento do broto terminal; maior susceptibilidade ao ataque de pragas e doenças; e a morte da planta, conforme a intensidade do déficit hídrico. Quando infectadas pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença “vassoura-de-bruxa” apresentam menor transpiração e condutância estomática em relação às sadias (JUNIOR et al., 2011).

2.1.5. Compostos orgânicos voláteis do cupuaçuzeiro em interação inseto-planta

Estudos relacionados à comunicação química entre insetos e plantas constituem um importante passo para o desenvolvimento de ferramentas que podem ser aplicadas no MIP. A identificação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos pelas plantas e suas interações com os insetos, pode gerar medidas alternativas ao uso de agrotóxicos (COOK et al., 2007).

Leskey et al. (2014) relatam que os esforços para reduzir os insumos de inseticidas contra o curculio de ameixa (*C. nenuphar*) incluem o uso de uma abordagem de "atrair e matar". Segundo os autores, os estímulos olfativos padrões são suficientes para fornecer

agregação dentro de armadilhas, mas esse outro meio (atrair e matar) deve ser usado para gerenciá-los após a chegada nos pomares.

Estudos em olfatômetro para avaliar respostas de *C. nenuphar* a voláteis de planta hospedeira e o seu feromônio de agregação, o ácido grandisoico e odores de machos vivos, revelaram que os compostos orgânicos voláteis (COVs) da essência da ameixa foi considerada o odor mais atrativo para as fêmeas virgens e imaturas, tanto em laboratório como no campo (COOMBS, 2001; WHALON et al., 2006; AKOTSEN-MENSAH et al., 2010; HOCK et al., 2017), indicando sua possível utilização como componente em armadilhas no campo.

Recentemente, foram identificados os COVs associados as cinco fases fenológicas da goiaba (*Psidium guajava* L.), nas quais se detecta a presença do *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 e se confirmou o papel do limoneno como caimônio na interação *P. guajava* -*C. psidii* Marshall. Na comunicação do *C. psidii* participam caimônios provenientes de sua planta hospedeira e um feromônio de agregação macho-específico. Segundo o estudo, os semioquímicos identificados poderão ser usados como atraentes em armadilhas para detecção, o monitoramento e o manejo do *C. psidii* em cultivos da goiaba (FRÍAS, 2015).

Estudos preliminares sobre os voláteis do cupuaçu em dois estágios fisiológicos (vegetativo e reprodutivo) e somente dos frutos, em dois períodos (diurno e noturno) mostraram que não há diferença na composição das misturas liberadas nos dois períodos considerados. A mistura de voláteis é composta por uma série de monoterpenos, sesquiterpenos e alguns aromáticos. A análise química dos extratos de aeração das plantas no estágio vegetativo e reprodutivo identificou quarenta compostos orgânicos voláteis majoritários, da mesma classe de compostos identificados nos frutos. Porém os estudos para avaliar a influência desses compostos no comportamento de *C. humeropictus* não foram concluídos pelos autores (BORGES et al., 2015).

De maneira geral, os registros de literatura para estudos de semioquímicos do cupuaçuzeiro e as interações inseto-planta ainda são escassos ou não estão estabelecidos. Apesar de estudos preliminares do perfil de voláteis, ainda não se sabe por exemplo, qual o papel desses compostos na defesa direta e indireta das plantas. Contrariamente, para a cultura do algodão por exemplo, já existem pesquisas que visam formular uma mistura volátil derivada da planta hospedeira que poderia ser usada para aumentar a eficácia do sistema atual de monitoramento dessa praga, que é o seu feromônio de agregação (OLIVEIRA et al., 2014; MAGALHÃES et al., 2016;).

2.2. A espécie *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae)

2.2.1. Descrição taxonômica

O gênero *Conotrachelus* possui mais de 1.100 espécies. Alguns dos seus membros são economicamente importantes devido aos danos causados em frutíferas neotropicais (O'BRIEN; COUTURIER, 1995).

Fiedler (1940) elaborou as chaves para a espécies de *Conotrachelus*. Entretanto, na descrição transcrita por Booth et al. (1990) os espécimes são originários do Brasil e Guiana, sendo que suas larvas desenvolvem-se em sementes e casca de frutos de cacau.

Trevisan e Mendes (1991) relatam que a taxonomia de *C. humeropictus* descrita por Fiedler (1940), foi baseada em dois espécimes coletados em Aga (provavelmente o município de Tefé, AM) e o outro procedente do Vale Demerara, na Guiana, ambos sem registro da planta hospedeira.

É um besouro bicudo, marrom-escuro, medindo cerca de 8 mm de comprimento e 5 mm de largura. Apresenta pontuações amarelo-douradas e estrias longitudinais nos élitros (Figura 2). O macho tem seis ventritos e as fêmeas cinco (dimorfismo sexual) (Figura 3). O último ventritos do macho é reduzido e nem sempre de fácil visualização a olho nu. Os ovos (Figura 4A), brancos-leitosos, elíptico (0,26 mm de comprimento e 0,16 mm de largura) tornam-se amarelo-palha no final do desenvolvimento embrionário (LOPES, 2000). As larvas são ápodas, branco-leitosas, apresentando cápsula cefálica marrom-avermelhada e mandíbulas bem desenvolvidas (Figura 4A). Quando totalmente desenvolvidas medem cerca de 14 mm de comprimento. As pupas, do tipo exarada, inicialmente são branco-leitosas (Figura 4A), tornando-se castanho-claras à medida que se aproximam da emergência dos adultos.



Figura 2 Adulto de *Conotrachelus humeropictus*



Figura 3 Vista inferior do abdome de uma macho e de uma fêmea de *C. humeropictus*. Separação dos sexos com base em observação da região esternal do último segmento abdominal.



Figura 4 A) ovo; B) larvas e C) pupas de *Conotrachelus humeropictus*.

2.2.2. Sistemática, ocorrência e distribuição

A broca-do-fruto do cupuaçu pertence a ordem Coleoptera, família Curculionidae, tribo Conotrachelini, subfamília Molytinae, gênero *Conotrachelus*. A literatura registra o gênero como típico do continente americano (BONDAR, 1937). Determinadas espécies são neotropicais, distribuídas desde a América Central à América do Sul (BONDAR, 1941; O'BRIEN; COUTURIER, 1995; RODRIGUEZ; CÁSAIRES, 2003) A maioria das espécies desse gênero (mais de 900), dentre elas *C. humeropictus*, foi descrita por Fiedler (1940) (O'BRIEN; COUTURIER, 1995) e são consideradas importantes pragas agrícolas.

Entre os principais representantes desse gênero nas regiões tropicais estão *C. humeropictus* em cupuaçu, *Conotrachelus Eugeniae* O'Brien em araçá, *C. dubiae* em camucamu e *C. psidii* em goiabeira e araçazeiro (SILVA FILHO, 2005). Além disso, há registro de dezenas de espécies desse gênero em plantas pertencentes às famílias botânicas: Sapotaceae, Myrtaceae, Leguminosae, Rosaceae, Guttiferaceae; Sapindaceae, Meliaceae, Sterculiaceae e Anonaceae (BONDAR, 1941 e 1944).

O primeiro registro de *C. humeropictus* foi em 1981, atacando frutos de cacau no estado de Rondônia (MENDES et al., 1982). Ocorrências em frutos silvestres como cacaú, *Theobroma speciosum* e *Theobroma microcarpum* também foram registradas (ALMEIDA; ALMEIDA, 1987). Segundo Aguilar e Gasparotto (1999) esta broca está disseminada em regiões com médias de temperatura variando entre 21,6 e 27,5 °C, umidade variando de 64% a 93% e precipitação anual entre 1.900mm e 3.100mm.

Para Trevisan et al. (2011), o inseto-praga, está restrito a região amazônica, particularmente aos estados de Rondônia, Amazonas, Acre, Pará e Mato Grosso. Tem como plantas hospedeiras o cupuaçu (*T. grandiflorum*) e o cacau (*Theobroma cacao*). Por esse motivo, deve ser evitado o trânsito de material botânico dessas regiões para outras onde a presença de *C. humeropictus* é desconhecida (MENDES et al., 1988; VENTURIERI, 1993).

2.2.1. Danos e importância econômica

Os danos econômicos causados por insetos do gênero *Conotrachelus* são relatados para as mais diversas culturas. A broca-dos-frutos, é do ponto de vista fitossanitário a praga mais importante do cupuaçuzeiro, devido aos danos causados pelas larvas aos frutos (LOPES; SILVA, 1998; GONDIN et al., 2001; THOMAZINI, 2002; SILVA et al., 2016).

Nas últimas duas décadas, estudos constataram o aumento gradativo dos níveis de infestações de larvas de *C. humeropictus* em cultivos de cupuaçu no Amazonas (LOPES; SILVA, 1998). A produção de frutos decresceu, passando de 2.705 frutos/ha em 1996 para 1.856/ha em 2006 (SOUSA et al., 2007). Segundo Garcia et al. (1997) a broca-do-fruto se destaca entre os fatores responsáveis por essa redução. Atualmente, esta praga assume posição principal como fator limitante à expansão desta frutífera, em função da severidade de seus danos (LOPES; SILVA, 1998; LOPES, 2000; THOMAZINI, 2002; SILVA; PAMPLONA 2011).

As larvas são responsáveis pelos danos diretos ao fruto. Os danos indiretos são causados pelos microrganismos e insetos que penetram através dos furos construídos pelas larvas que saem para se transformar em pupa no solo (TREVISAN; MENDES, 1991). Quando a oviposição ocorre em frutos jovens, os frutos caem e as larvas não se desenvolvem. Os frutos atacados que atingem o amadurecimento apresentam a polpa destruída pela fermentação causada pelos organismos decompositores (AGUILAR; GASPAROTTO, 1999).

Os agricultores que se dedicam ao cultivo do cupuaçuzeiro reconhecem a importância de novas tecnologias que possam auxiliar no controle de pragas como forma de evitar perdas significativas dos plantios. Todavia, normalmente se deparam com a escassez de informações ou métodos de controle eficientes para a broca-do-fruto. Nenhuma técnica isolada de controle para esta praga se encontra disponível, o que pode levar alguns produtores a recorrerem ao uso de agrotóxico. Prática esta já testada em cupuaçu e cacau sem resultados satisfatório, além de antieconômica e elevado impacto ambiental (GARCIA et al., 1988; COSTA et al., 2015).

2.2.2. Biologia

Trata-se de um besouro da espécie *Conotrachelus humeropictus*; Ordem Coleoptera e família Curculionidae (FIEDLER, 1940). Seu ciclo de vida ocorre em cinco estágios: ovo, larva, pré-pupa, pupa e adulto (MENDES, 1997).

Apesar dos relevantes trabalhos de Mendes (1997), Aguilar e Gasparotto (1999) e Lopes (2000) sobre a biologia de *C. humeropictus*, as lacunas a respeito da biologia desta espécie ainda é um obstáculo para condução pesquisas em diversos campos da entomologia, principalmente aquelas direcionadas ao controle.

Mendes (1997) descreve em seus resultados que as posturas de *C. humeropictus* ocorre de forma isolada, com posturas ocasionalmente constituídas por 02 a 03 ovos e média de 108,45 por fêmea. Segundo autor o maior número de ovos é colocado durante as primeiras posturas, entre o 18° e o 54° dia da emergência.

Mendes (1997) e Trevisan et al. (2011) descrevem os ovos por coloração branco-leitosa, tornando-se amarelo-palha, na medida em que acontece o desenvolvimento embrionário. Segundos os autores os ovos apresentam forma elíptica, com $0,26 \pm 0,01$ mm de comprimento e $0,16 \pm 0,01$ mm de largura e o período embrionário é de 04 a 06 dias com

média de 4,73 dias e viabilidade de 75,60 %, em média. Afirmam ainda que em condições naturais, é provável uma maior eclosão de larvas, já que não há manipulação e perda de água dos ovos no interior dos frutos.

Lopes (2000) caracteriza as larvas como ápodas de cor branco-leitoso, apresentando cápsula cefálica marrom avermelhada e mandíbulas bem desenvolvidas. De acordo com a autora, as larvas apresentam quatro ínstaes e é nesta fase considerada praga, quando o inseto causa o dano direto no cupuaçu. Ressalta ainda que frutos altamente infestado por larvas não completam a maturação e caem antes da semente solidificar.

A larva recém-eclodida apresenta cerca de $0,81 \pm 0,02$ mm de comprimento. É comum encontrar larvas de quarto instar se alimentando do conteúdo das sementes dos frutos. Ao atingir o máximo desenvolvimento larval, em média 26,64 dias da eclosão mede aproximadamente $17,21 \pm 0,34$ mm de comprimento, então, cessa sua alimentação e, abandonando o fruto, prepara a "câmara pupal" no solo e, cessando também seus movimentos, entra na fase pré-pupa, cujo período é, em média, de 6,07 dias. Nessa fase a viabilidade é de 99,59% (MENDES, 1997; TREVISAN et al., 2011; SILVA et al., 2016).

A pupa, do tipo exarada, quando recém-formada é branco-leitosa, tornando-se castanho-claro, à medida que se aproxima a eclosão do adulto. Mendes (1997), cita o período pupal de 08 a 12 dias, com duração média de 9,62 dias e a viabilidade pupal de 97,12%. Para Lopes (2000), a duração do período pupal varia de 22 a 121 dias para machos, com média de 65 dias e de 22 a 174 dias para fêmeas, com média de 73 dias.

O adulto teneral, de cor castanho claro e $9,87 \pm 0,13$ mm de comprimento permanece, por um período de 03 a 06 dias (média 4,56 dias), praticamente imóvel na antiga "câmara pupal" quando, então, emergem do solo. A esse período Paradis (1956) e Smith (1957) para *Conotrachelus nenuphar* e Tedders; Payne (1986) para *Conotrachelus schoofi*, denominaram de estágio imaginal e de pré-emergência do adulto, respectivamente.

Trevisan et al. (2011) destacam que ambos os sexos apresentam 5 esternitos visíveis quando em posição ventral. Nos machos este esternito apresenta uma depressão central e nas fêmeas duas depressões laterais, adicionalmente nos machos, e em posição ventral, é visível o último tergito abdominal. Os machos apresentam um aparelho estridulatório na margem interna dos élitros.

Os registros de Mendes (1997) mencionam que a cópula ocorre no mesmo dia da emergência, após a distribuição das fêmeas em gaiolas, dura de 75 a 105 minutos (média 89,25 minutos), com casais copulando mais de uma vez, indicando que os machos são capazes de fecundar mais de uma fêmea. Segundo o autor, este comportamento também foi constatado para as espécies *C. nenuphar* (SMITH, 1957) e *C. schoofi* (TEDDERS; PAYNE, 1986).

Estudos conduzidos por Lopes (2000) sobre a biologia, comportamento e flutuação populacional *C. humeropictus*, mantidos individual e em casais à temperatura de $25,0 \pm 0,1^\circ$ C, umidade relativa $78,0 \pm 0,4\%$, com fotofase de 12 horas, constataram que os insetos mantidos em casais viveram em média maior número de dias ($197,46 \pm 51,85$ para machos e $205,38 \pm 68,38$ para fêmeas) que os insetos mantidos individualmente ($88,94 \pm 17,85$ para machos e $94,24 \pm 22,39$ para fêmeas).

As fêmeas apresentaram em média maior tempo de vida que os machos (GARCIA, et al., 1988; MENDES, 1997), no entanto, estas quando mantidas em casais tiveram representantes com menor longevidade. Segundo os autores, os indivíduos em agregados são mais longevos que os insetos vivendo de forma isolada.

2.2.3. Atividades comportamentais

Adultos de *C. humeropictus* são mais ativos no período noturno, durante o dia ficam ocultos entre as folhagens e, ao sentirem-se ameaçados, jogam-se sobre o solo. Esse comportamento foi observado tanto na cultura do cacau (TRAVISAN, 2011) como na cultura do cupuaçu (LOPES, 2000). Esse comportamento é típico da família, em qualquer substrato que se encontram.

Lopes (2000) constatou que em frutos de cupuaçu, as fêmeas apresentaram preferência pela parte mediana do fruto para postura. Inicialmente, as fêmeas fazem várias perfurações para alimentação do fruto e depois efetuam as posturas. As perfurações podem ser próximas e em grupos de 2 a 4, mas podem ser encontrados conjuntos com numerosos furos de diâmetro entre 0,50-2,0 mm.

O autor relata que as fêmeas desempenham mais de um tipo de atividade para oviposição, que inclui: exploração do fruto, formação de perfuração e alimentação, disposição crescente de alimentação e postura dos ovos. Após a oviposição os insetos iniciam nova

sequência. No campo, a oviposição é maior nos frutos verdes com cerca de dois meses antes da maturação destes, assim como, os maiores ataques de pragas ocorrem em plantas localizadas a próximas à floresta.

Adultos de *C. humeropictus* formando casais de igual e diferentes idades, quando avaliados em laboratório nos horários diurnos e noturnos, à temperatura de $26,0 \pm 0,1^\circ \text{C}$, umidade relativa de $74,0 \pm 0,9\%$ em 1997 e em 1998 à temperatura de $25,0 \pm 0,1^\circ \text{C}$ e umidade relativa de $84\% \pm 0,4\%$ apresentaram quatro atividades comportamentais mais frequentes: comportamento de repouso, locomoção, alimentação e acasalamento (LOPES 2000).

Machos e fêmeas de 15 dias de idade apresentaram maior porcentagem média nas atividades de locomoção ($23,42 \pm 5,78$) e acasalamento ($2,77 \pm 0,48$). Insetos de todas as idades ficaram mais tempo em repouso ($77,1 \pm 4,8$) tanto para o período diurno quanto noturno. Chouinard et al. (1993), encontraram essa tendência em *C. nenuphar* observados em ambiente seminatural.

Em repouso, o inseto permanece com as antenas e rostro curvados para baixo, e os três pares de perna ficam totalmente encolhidas. A principal forma de locomoção de adultos da broca-do-fruto de cupuaçuzeiro é por caminhamento, entretanto, os insetos se deslocam em voos de curta distâncias. Durante a noite os besouros locomovem-se mais (LOPES, 2000, TREVISAN 2011).

Mendes et al. (1997), registraram acasalamento de *C. humeropictus* pela primeira vez no mesmo dia da emergência. Lopes (2000), relata que casais de *C. humeropictus* machos e fêmeas de 15 dias de idade apresentaram as atividades de corte e acasalamento no intervalo de 8:00 às 15:00 horas com pico às 13:00 horas. Macho e fêmeas de 1 dia acasalaram no período de 9:00 às 15:00 horas. Machos adultos de 15 dias e fêmeas de 1 dia acasalaram no terceiro dia de observação. Estudos de comportamento de *C. nenuphar* com diferentes idades, relataram que a idade do primeiro acasalamento para machos e fêmeas foi a partir do 6º dia de vida e que aumentou o número de casais que acasalaram pela primeira vez, com o avanço da idade de machos e fêmeas até o 16º de observação. (JHOSON; HAYS, 1969).

Resultados obtidos por Lopes (2000) revelam que a corte e acasalamento foram atividades verificadas exclusivamente durante o horário diurno até as 17:00 horas. Para essa autora, ao contrário do que se acreditava, a broca-do-cupuaçu apresenta comportamento diurno que inclui alimentação, acasalamento e oviposição, além de hábitos noturnos de voo,

queda brusca da planta para o chão, alimentação e caminhar como principal forma de locomoção.

Igualmente a escassez de trabalhos sobre a biologia de *C. humeropictus*, o desconhecimento do comportamento desta espécie tem se constituído obstáculo para condução de pesquisas em diversos campos da entomologia, como por exemplo o estudo da ecologia química de inseto aplicada a agricultura.

2.2.4. Manejo e controle

Apesar dos avanços em pesquisas sobre a biologia e comportamento da broca, ainda não existe um método de controle eficiente deste inseto. Nenhuma técnica isolada de controle para esta praga encontra-se disponível. Não há nenhum inseticida registrado para a cultura, específico à broca-do-fruto (THOMAZINI, 1998; AGUILAR; GASPAROTTO, 1999; SOUZA, 2007; TREVISAN, 2011).

De um modo geral, plantios bem conduzidos, quanto à limpeza, adubação, podas de formação e de manutenção e tratamentos fitossanitários, apresentam menos problemas com pragas e doenças (SILVA; ALFAIA, 1998; SOUZA, 2007; TREVISAN, 2011).

Os métodos de controle da broca atualmente encontrados na literatura são: monitoramento, métodos culturais, método biológico e método químico (TREVISAN, 2011).

Recomenda-se na época da safra, fazer inspeções frequentes, principalmente em locais próximos à mata, para verificar se existem frutos atacados, ou seja, aqueles caídos no chão e com orifício de saída da broca. Neste caso, sugere-se que sejam retirados, colhidos e destruídos, pois agindo assim, interrompe-se o ciclo de vida do inseto (THOMAZINI, 1998; SILVA; ALFAIA, 1998; TREVISAN, 2011).

Para o controle da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro em sistemas agroflorestais (SAFs), Silva e Alfaia (1998) recomendam um conjunto de medidas que devem ser tomadas de forma integradas:

Evitar o estabelecimento de plantios de cupuaçu em áreas recentemente plantadas com cacau ou próxima de plantios abandonados;

- Evitar formação de novos SAFs em áreas muito próximas à floresta e/ou capoeira, evitando incluir plantas de copa densa, que possam sombrear intensamente as árvores de cupuaçu;
- Na formação de novos SAFs, usar mudas bem formadas de viveiristas licenciados, priorizando culturas de diferentes famílias botânicas, incluindo, quando possível, plantas aromáticas na bordadura dos SAFs;
- Para os SAFs já estabelecidos, fazer calagem seguida de adubação fosfatada e potássica em coroamento;
- Desbastar as castanheiras quebradas e remover toda vegetação sem valor econômico, inclusive rasteira, para redução do nível de sombreamento e favorecimento da circulação do ar no interior dos SAFs;
- A vegetação rasteira só deverá ser removida no início da estação chuvosa, porque o cupuaçuzeiro é extremamente sensível a perda de umidade;
- Podar as árvores de cupuaçu com remoção dos galhos inferiores (elevação da saia), para desencostá-los do solo; (Obs.: Esta prática deve ser feita por pessoa treinada);
- Colher, preferencialmente nas primeiras horas da manhã, todos os frutos brocados do interior dos SAFs, com posterior queima ou enterrio em valas de, no mínimo, 1m de profundidade ou afogando em água durante três dias;
- Formar aceiros de, no mínimo, 20 m entre a mata/capoeira e o SAF com plantio de vegetação rasteira (aromática) nas bordaduras;
- Priorizar a quebra dos frutos fora da área de cultivo, para evitar possível penetração das larvas no solo;
- Realizar limpeza periódica dos veículos de transporte dos frutos, para evitar a disseminação da praga entre as propriedades;
- Efetuar inspeções na plantação a cada 15 dias para verificar a presença de frutos atacados e;
- Efetuar o transporte dos frutos sobre lona ou carrocerias sem frestas.

Aguilar e Gasparotto (1999) atestam que o método do controle biológico da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro mediante parasitóides e predadores apresenta certas limitações, devido ao próprio habito da praga, que dificulta o contato com os inimigos naturais. Entretanto, existe um campo promissor para o controle da broca envolvendo este método, tendo em vista a utilização de parasitóides já identificados em *C. humeropictus* ou mesmo em outras espécies como *Conotrachelus eugenia*.

Mendes (1996) recomenda que a utilização, no campo de entomopatógenos, tais como: os fungos *Metarrhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* deve ser alvo de futuros trabalhos de pesquisa. Garcia et al. (1997) relatam que cerca de 70% das larvas de *Conotrachelus* sp. que penetram no solo para pupar não completam o ciclo e morrem devido ao ataque de fungos e outros parasitas.

Garcia et al. (1997) orientam que para o controle da praga não é recomendável o uso de agrotóxicos, uma vez que este processo já foi testado para o curculionídeo em plantações de cacau e, mais recentemente em cupuaçu (COSTA et al., 2015) e não apresentou efeito positivo. Segundo esses autores, o custo desse processo é alto, economicamente inviável e de elevado impacto ambiental.

Por último, embora não se conheça, na literatura, alguma referência a algum tipo de resistência ou graus de resistência dos frutos do cupuaçuzeiro à broca. Alguns autores aconselham realizar testes em frutos sem sementes, os quais podem ser menos atacados pela falta de alimentos, tendo em vista que as exigências nutricionais da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro na fase larval são preenchidas pelas sementes do fruto (MENDES; TREVISAN, 1991; AGUILAR; GASPAROTTO; 1999).

Os semioquímicos dos insetos e plantas combinados com as recomendações de controle cultural listadas acima e uso de controle biológico (como fungos e nematóides) podem gerar um manejo integrado de *C. humeropictus* para a cultura do cupuaçu. O uso do feromônio de agregação da espécie e de atrativos voláteis do cupuaçu poderão auxiliar no monitoramento e controle da praga. Os semioquímicos vem sendo aplicados nas mais diferentes culturas com bastante sucesso, inclusive para curculionídeos no Brasil, como para *Anthonomus grandis* na cultura do algodão (MAGALHÃES et al., 2016), e para *Cosmopolites sordidus* na cultura da banana (MESQUITA, 2003), por exemplo. Em sistema agroflorestais, onde deve se evitar o uso de agrotóxicos por questões ambientais, para evitar atingir organismos não alvos, e para obter alimentos mais saudáveis para o consumidor final. O uso de semioquímicos pode auxiliar no manejo de pragas de uma forma mais sustentável e inclusive com menor custo (BENTO et al., 2016; BORGES; BLASSIOLI-MORAES, 2017). Hoje a produção de uma nova molécula com efeito inseticida pela indústria química tem um custo médio de 200 milhões de dólares e pode levar de oito a 10 anos para estar disponível (WHITFORD, 2009). Isso explica por que tão poucas moléculas novas estão sendo colocadas à disposição da agricultura no mundo e a urgência de desenvolvermos novos métodos de manejo e controle de pragas.

2.2.5. Semioquímicos no manejo de *Conotrachelus humeropictus*

Os semioquímicos estão presentes em inúmeras espécies de Curculionídeos (BARTELT, 1999; SEYBOLD; VANDERWEL, 2003; AMBROGI et al., 2009). Normalmente, os machos produzem os feromônios e via de regra, esses feromônios atraem ambos os sexos (ELLER; BARTELT, 1996; TUMLINSON et al., 1969).

Segundo Ambrogi et al. (2009), as espécies pragas de Curculionidae com compostos feromonais já identificados pertencem a 6 subfamílias (Conoderinae, Curculioninae, Dryophthorinae, Entiminae, Lixinae e Molytinae) e 10 tribos (Piazurini, Anthonomini, Curculionini, Rhynchophorini, Eustylini, Sitonini, Cleonini, Pissodini, Sternechini e Conotrachelini). Os autores ressaltam que esses insetos, são importantes pragas nas culturas de mamoeiro, pimenta e pimentões, algodoeiro, morangueiro, bananeira, palmáceas, abacaxizeiro, cana-de-açúcar, coqueiro, leguminosas, beterraba, maçã e soja, respectivamente.

A utilização dos feromônios em programas de manejo de pragas é crescente e atende ao modelo recomendado para a agricultura do futuro (WITZGALL et al., 2010; BENTO et al., 2016; BORGES; BLASSIOLI, 2017). Os feromônios são específicos, atuam sobre a espécie alvo, e apresentam baixa toxicidade a mamíferos nas quantidades utilizadas no campo, na ordem de nanogramas a pouco miligramas. Essas características conferem aos feromônios vantagens comparativas enormes sobre os agrotóxicos. Os agrotóxicos são extremamente tóxicos ao organismo alvo e aos organismos não alvos, como os inimigos naturais.

Na literatura existem inúmeros registros da utilização de semioquímicos no controle e monitoramento de pragas. Segundo Silva Filho (2005) armadilhas iscadas com semioquímicos foram utilizadas com sucesso na coleta do gorgulho-da-cana-de-açúcar, *Metamasius hemipterus* (CERDA et al., 1999), no controle da broca-do-coqueiro, *Rhynchophorus palmarum* (JAFFÉ et al., 1993; GILBLIN-DAVIS et al., 1994), do bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* (DICKENS, 1989; ROCHAT et al., 1991), do gorgulho-da-pimenta, *Anthonomus eugenii* (ELLER et al., 1994), do gorgulho-do-arroz, *Sitophilus oryzae* (PHILLIPS et al., 1993; TIGLIA et al., 1995), do gorgulho-da-batata-doce, *Cylas formicarius* (JANSSON et al., 1992) e dos gorgulhos-dos-pinheiros, *Hylobius radicis* e *Pachylobius picivorus* (HUNT; RAFFA, 1989), entre outros.

Entre espécies do gênero *Conotrachelus* com o feromônio de agregação isolado, sintetizado e testado, está a espécie *C. nenuphar*. Machos de *C. nenuphar* produzem como feromônio de agregação o ácido grandisoico (ELLER; BARTELT, 1996; HOCK et al., 2017).

Testes de campo revelaram que tanto a mistura racêmica do ácido grandisoico como os enantiômeros puros atraem machos e fêmeas da espécie. Armadilhas desenvolvidas para o monitoramento de *C. nenuphar* iscadas com semioquímicos apresentaram boa eficiência na coleta do gorgulho em pomares de ameixa, maçã e pêra (ELLER; BARTELT, 1996; PROKOPY et al., 1997; PROKOPY et al., 2003; LESKEY; WRIGHT, 2004).

Estudo com semioquímicos envolvidos na interação gorgulho-da-goiaba (*Conotrachelus psidii* Marshall, 1922) e goiabeira (*Psidium guajava* L.), sugere a existência de um feromônio de agregação produzido por ambos os sexos (SILVA FILHO, 2005).

Frías (2015) afirma que entre os compostos orgânicos voláteis orgânicos identificados na planta de goiabeira, dois foram também detectados tanto nos machos como nas fêmeas de *C. psidii*, sugerindo se tratar de cairomônios.

Para essa autora os compostos papayanol e o papayanal liberados especificamente pelos machos de *C. psidii*, indicam tratar-se possivelmente dos componentes de seu feromônio de agregação. Ressalta ainda que o monoterpene limoneno combinado com o feromônio (1R,2S,6R)-papayanol tem potencial para a detecção e o monitoramento do bicudo da goiaba, no campo, como uma estratégia útil para ser incluída dentro do programa de manejo integrado desta praga.

Recentemente, Palácio-Cortés et al. (2015), mencionam que, machos de *C. psidii* produzem um composto masculino específico, o papayanol, que na presença de voláteis de plantas é altamente atraente para ambos os sexos. Esses autores, informam que futuras experiências de armadilhas no campo serão realizadas para desenvolver um método ambientalmente seguro para monitorar ou controlar este inseto em pomares de goiaba usando seu feromônio de agregação em combinação com voláteis de plantas.

Apesar dos avanços e dos milhares de registros na literatura de compostos identificados como feromônio de insetos (THE PHEROBASE, 2017), sabe-se muito pouco sobre a função destes compostos na comunicação química entre inseto-inseto ou inseto-planta para torná-los uma nova ferramenta no manejo de inimigos naturais e outros insetos.

Estudos de ecologia química com as principais pragas da cultura do cupuaçuzeiro, em especial, a broca-do-fruto, são raros. Entretanto, pesquisa recente, revela a presença de três compostos machos específicos para *C. humeropictus*, que foram identificados como (1R, 2S) -grandisol, ácido (1R, 2S) -grandisoico e uma lactona de terpeno bicíclico (1R, 6R) -2,2,6-trimetil-3-oxabicyclo [4.2.0] octan-4-ona, denominada de grandisolactona. Provavelmente eles irão atuar como feromonas de agregação (SZCZERBOWSKI et al., 2016). No entanto, os

autores não conduziram estudos comportamentais nem testes de campo para confirmarem que estes compostos tem função feromonal para esta espécie.

Análises químicas dos extratos de voláteis de machos e fêmeas apresentaram um composto específico do macho que foi identificado como o ácido grandisoico. A identificação deste composto é uma informação importante para o avanço nas pesquisas com feromônio de *C. humeropictus* (BORGES et al., 2015; BORGES et al., 2017).

Torrens (2015) assinalou a presença de quatro compostos produzidos por machos da espécie *C. humeropictus*. Segundo o autor, a liberação do feromônio ocorre na sua maior concentração durante o período noturno. Os testes de atratividade em laboratório de machos e fêmeas para os compostos na forma sintéticas mostraram que a presença da lactona, foi fundamental na atratividade de fêmeas. Porém, uma avaliação preliminar, no campo, na qual foram testados os compostos, ácido grandisoico e lactona, em nenhum tratamento foi obtido insetos capturados nas armadilhas.

As informações disponíveis mostram que existem lacunas desde a prospecção até a efetiva atratividade e controle por meio desses compostos ao *C. humeropictus*. Nesse sentido, explorar a ecologia química da broca-do-cupuaçu é acolher uma demanda social por ambiente e produtos utilizados na alimentação humana livre de agrotóxicos e herbicidas. De modo geral, é necessário que sejam discutidas diferentes forma de utilizar os semioquímicos para o manejo de pragas, suas principais vantagens e desvantagens, os desafios futuros e exemplos de sucesso da aplicação e uso do semioquímicos para o Brasil (BLASSIOLI-MORAES et al., 2009; BORGES et al., 2011; BORGES et al., 2015).

2.3. Semioquímicos

2.3.1. Semioquímicos e interações ecológicas

Interações entre plantas e insetos devem ser compreendidas sob um ponto de vista co-evolutivo (EHRlich; RAVEN, 1964; BLANDE, 2017). Semioquímicos envolvidos nessas interações constituem um foco central de estudos ecológicos e evolutivos em constante expansão (BLANDE, 2017).

Segundo Kessler (2015), as interações ecológicas entre plantas e insetos são mediadas por uma diversidade de metabólitos produzidos pelas plantas. Para Agelopoulos et al. (1999) essas informações (metabólitos) são fundamentais e particularmente importantes para os insetos, por exemplo, para localizar fontes de alimento. Os semioquímicos que medeiam a

comunicação intraespecífica são denominados de feromônios, enquanto que os envolvidos na comunicação interespecífica são chamados de cairomônios, sinomônios e alomônios. Cairomônios são substâncias voláteis que atuam entre espécies diferentes, favorecendo apenas o receptor da informação, sinomônios são substâncias que quando emitidas resulta em benefícios para ambos e alomônios resulta em benefício para o emissor. Essa troca de mensagens químicas também ocorre entre plantas, microrganismos e animais regulando populações (BORGES et al., 2015).

Os semioquímicos liberados pelas plantas podem ser percebidos por uma gama diversificada de organismos em sua comunidade e ainda informar sua condição fisiológica (HELMS et al., 2013). Para esses autores, as plantas também podem detectar e processar informações químicas derivadas de herbívoros. Sinais olfativos derivados de insetos podem transmitir informações específicas às plantas em relação ao tipo de ameaça e seu imediatismo. Portanto, detectar tais informações e utilizá-lo para a implantação efetiva de defesas é potencialmente benéfico para a planta (BLANDE, 2017).

É notório que o entendimento das interações inseto-planta na perspectiva da comunicação química precisa ser continuamente explorado. Tendo em vista, por exemplo, que a prospecção de substâncias semioquímicas, associada a estudos biológicos das espécies envolvidas, pode gerar novos produtos para uso no manejo integrado de pragas (BORGES et al., 2015).

2.3.2. Semioquímicos e o manejo de insetos-pragas

O semioquímico é um sinal químico (volátil ou não volátil) que permite a comunicação entre organismos vivos. Entre estes, os insetos constituem o grupo de animais onde a comunicação química é crucial para sua sobrevivência e garantia da perpetuação das espécies. Os insetos utilizam a comunicação química para localizar o parceiro para acasalamento, localizar alimento, plantas hospedeiras e identificar situações de perigos (DELLA-LUCIA, 2001; WYATT, 2014; LIMA; BLANDE, 2017).

O estudo dos semioquímicos com vistas ao manejo de pragas, tem sido o foco de estudos da ecologia química como disciplina científica, desde a identificação do primeiro feromônio sexual de um inseto, o composto bombicol (*E,Z*)10,12-hexadecadien-1-ol) da mariposa da seda (*Bombyx mori*) (BUTENANDT et al., 1959; TEWARI et al., 2014). A

utilização de semioquímicos como compostos não tóxicos, exclusivos de espécies e que não prejudicam insetos benéficos, constitui a base para estratégias de manejo eficientes e sustentáveis (WITZGALL et al., 2010).

Registros da literatura confirmam que, especialmente feromônios sexuais, têm sido investigados intensivamente por pesquisadores da área de controle de pragas por mais de uma década. Os resultados apontam bons caminhos para o seu emprego e vários programas que os utilizam têm sido implementados com sucesso (WITZGALL et al., 2010; BENTO et al., 2016; WEBER et al., 2017).

Atualmente feromônios e outros semioquímicos são aplicados para manejo de pragas em milhões de hectares no mundo todo (WITZGALL, 2010). No Brasil o uso vem aumentando a cada ano, mas não há número disponíveis sobre esse uso. Em São Paulo, Bento et al. (2016) analisando os benefícios econômicos do uso a longo prazo de armadilhas iscadas com o feromônio sexual da perfuradora de citros, *Gymnandrosoma aurantianum* Lima, 1927 (Lepidoptera: Tortricidae) mostraram que de 2001 a 2013, os produtores de citros evitaram perdas de pragas acumuladas de 132,7 milhões a 1,32 bilhões de dólares em receita bruta, considerando possíveis perdas de safras na faixa de 5 a 50%, causadas por esta praga. A área analisada, 56.600 a 79.100 hectares de citros (20,4 a 29,4 milhões de árvores) corresponde a 9,7 a 13,5% da área total plantada com citros no estado de São Paulo. Segundo os autores, o estudo demonstra que os feromônios sexuais são ferramentas importantes para os produtores e para o ambiente, pois seu uso para o monitoramento de populações permite o uso racional e reduzido de inseticidas.

No sul do país, na cultura da maçã, o feromônio da mariposa *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) é usado para o seu controle usando a técnica de confundimento sexual (ARIOLI et al., 2009; BOTTON et al., 2011), e o feromônio da mariposa *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) para o seu monitoramento (TESTASECCA, 2013). A *C. pomonella* foi erradicada do Brasil e o feromônio é usado para checar sua presença ou não em programa de erradicação de *C. pomonella*. Os feromônios podem ser aplicados em diferentes contextos e técnicas junto com outras práticas do manejo integrado de pragas (WITT, 2016).

Borges et al. (2011) mostraram que o feromônio sexual do percevejo marrom é mais eficiente para o seu monitoramento do que a técnica comumente utilizada para

monitoramento, o pano de batida. Segundo os autores, as vantagens de se usar o feromônio para monitoramento são: menores custos, facilidade de uso, não são tóxicos, não deixam resíduos no meio ambiente, são específicos, agindo somente sobre a espécie alvo, são usados em doses baixas (nanogramas a poucas miligramas) e tem alta sensibilidade de detecção.

O modelo de agricultura do futuro exige a adoção de métodos efetivamente mais sustentáveis nos sistemas produtivos. Substituir os agrotóxicos por moléculas ambientalmente benéficas e mais específicas ainda é um desafio de pesquisa atual (WITZGALL et al., 2010).

Moscardi et al. (2011) relatam que o uso de feromônios sexuais combinadas com outras medidas de controle, como o controle biológico, pode ser uma estratégia importante para gerenciar *Spodoptera* spp. no Brasil e para minimizar a grande quantidade de inseticidas atualmente utilizados para controlar populações de *Spodoptera* em campos de cultivo. Estudos recentes sugerem que a identificação de uma mistura atraente de feromônios para diferentes espécies poderia ajudar a desenvolver uma técnica de monitoramento de múltiplos alvos (BLASSIOLI- MORAES et al., 2016).

Pinto-zevallos et al. (2013) ressaltam que embora a efetividade dos feromônios seja bem reconhecida, a adoção de feromônios sintéticos não pode ser feita sem uma base sólida de conhecimento. O sucesso da utilização de feromônios precisa de um amplo conhecimento da ecologia e biologia das pragas, o que implica a necessidade de envolver químicos, ecologistas, biólogos e agrônomos nas pesquisas de laboratório e campo.

Nesse sentido, é fundamental para o processo de implantação de feromônios como uma metodologia alternativa ao controle de insetos pragas, que tenham grupos de pesquisa capacitado a realizar o processo de prospecção, isolamento e identificação estrutural no Brasil, em especial nas regiões como a Amazônia onde os estudos com ecologia química de insetos aplicada a agricultura ainda são escassos (MOREIRA et al., 2005).

Certamente, é oportuno e significativo investir ainda mais na pesquisa sobre produtos químicos modificadores de comportamento para o gerenciamento sustentável de insetos (KLASCHKA, 2009; WITZGALL et al., 2010).

2.3.3. Cairomônios em insetos-pragas

Os compostos orgânicos voláteis de plantas são potencialmente úteis para aplicação na agricultura. O uso desses compostos para o manejo de pragas insere-se como uma alternativa viável na busca por sistemas ambientalmente sustentáveis (RIFFEL; COSTA, 2015).

Os voláteis emitidos pelas plantas desempenham papéis importantes na sua de defesa e reprodução (PICHERSKY; GERSHENZON, 2002). Kessler e Baldwin (2001) afirmam que os voláteis emitidos de tecidos vegetativos, como parte do sistema de defesa da planta, podem repelir ou intoxicar animais e microrganismos diretamente, ou atrair inimigos naturais, que protegerão a planta indiretamente. Shulaev et al. (1997) ressaltam que esses voláteis podem alertar plantas vizinhas a respeito de um ataque de algum herbívoro ou patógeno, preparando estas plantas para responder mais rapidamente em um ataque futuro, conhecido como efeito “priming”, estado de alerta.

Os cairomônios desempenham diferentes funções na interação inseto-planta. Podem atuar como repelentes, inibir feromônios de alarme, induzir a oviposição e provocar respostas nos receptores olfativos dos insetos (WEBSTER et al., 2008; VERHEGGEN et al., 2008).

Espécies como o bicudo da ameixa, *Conotrachelus nenuphar* Herbst, 1797 (Coleoptera; Curculionidae), Bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae) e o bicudo da cana-de-açúcar, *Diaprepes abbreviatus* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Curculionidae) são exemplos de besouros que utilizam os compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por sua planta hospedeira para encontra-las (HOCK et al., 2017; PROKOPY et al., 1995, BRUCE; PICKETT, 2011; MAGUALHÃES et al., 2012; HARARI; LANDOLT, 1997).

Grupos de pesquisa dedicados a estudos sobre os compostos orgânicos voláteis induzidos por herbivoria, principalmente nas grandes culturas, asseguram que o uso desses compostos seja uma das importantes estratégias a ser utilizada em controle de pragas (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013; BLASSIOLI-MORAES et al., 2013, 2016; MAGALHÃES et al., 2016).

Os produtos químicos derivados de plantas são conhecidos por melhorar a atração de iscas de feromônio. Inúmeros registros na literatura relatam que o sinergismo entre feromônios de insetos e os voláteis da planta hospedeira aumentam a atração de insetos. Por

este prisma, é possível que novas estratégias no manejo integrado de pragas possam ser desenvolvidas (CERUTI, 2007).

Em coleópteros por exemplo, a mediação do feromônio na agregação, particularmente aqueles atrativos produzidos pelos machos, é reconhecido por estar inter-relacionados com a presença de alimento (BORDEN, 2003). Wood (1982) menciona que alguns insetos adquirem compostos químicos da planta hospedeira e os usam como feromônios sexuais ou precursores de feromônio.

Mesmo os voláteis de plantas não-hospedeiras podem desempenhar um papel significativo no manejo de insetos, uma vez que alguns insetos evitam voláteis de plantas não-hospedeiras. Esse conhecimento (dos sinais voláteis negativos da planta) pode ser usado para projetar técnicas do tipo atraí-repele, do inglês push-pull (BORDEN 1997; ZHANG; SCHLYTER 2004; COOK et al., 2007).

Hock et al. (2017) afirmam que a sinergia entre odores de plantas e insetos pode aumentar as capturas e melhorar as técnicas de monitoramento de insetos no campo. Ceruti (2007) considera que o aumento da atração de machos, ou fêmeas, pelos odores da planta hospedeira resulte no desenvolvimento de armadilhas mais efetivas para o controle de pragas. Para o autor, iscas baseadas somente em feromônio sintético não são completamente atrativas para a maioria dos insetos e são improváveis de serem completamente competitivas com os sinais que emanam das plantas hospedeiras e dos alimentos. Isso seria esperado ocorrer principalmente com insetos especialistas, como o bicudo do algodoeiro, que tem uma relação muito específica com sua planta hospedeira, que apesar de ter fontes alternativas de alimentação, o mesmo só se reproduz nas plantas de algodão (RIBEIRO et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2016). Por outro lado, insetos generalistas como *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepdoptera: Noctuidae) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepdoptera: Noctuidae), são menos prováveis de sofrerem forte influência atrativa dos voláteis de plantas para encontrar a planta hospedeira. Nos insetos generalistas, no geral, o feromônio sexual tem grande atratividade, e não há a necessidade de utilizar a ação de cairomônios para melhorar a eficiência dos mesmos no campo.

Capítulo I

Avaliação da influência dos voláteis de diferentes estruturas (flor, fruto e folha) do cupuaçuzeiro sobre o comportamento de busca de *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae).

3. Avaliação da influência dos voláteis de diferentes estruturas (flor, fruto e folha) do cupuaçuzeiro sobre o comportamento de busca de *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae).

RESUMO

Os voláteis de plantas são responsáveis por induzirem inúmeras respostas no comportamento dos insetos. Este trabalho teve por objetivo analisar a influência dos voláteis emitidos pelo cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum*, em diferentes fenofases sobre o comportamento de busca de *Conotrachelus humeropictus*. As análises químicas dos extratos de aeração do cupuaçuzeiro mostraram que há diferença na composição das misturas de voláteis liberadas nas fenofases consideradas, floração, frutificação e mudança foliar. A classe de compostos liberadas nas diferentes fenofases foi similar sendo composto majoritariamente de monoterpenos, sesquiterpenos e alguns aromáticos. Os compostos majoritários encontrados na fase de mudança foliar foram os sesquiterpenos (*E,E*)- α -farneseno e β -cariofileno, os monoterpenos β -mirceno, limoneno e o homoterpenos (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT). Na fase reprodutiva (flor), os compostos majoritários foram os monoterpenos (*E*)-ocimeno, os sesquiterpenos β -cariofileno e (*E,E*)- α -farneseno e os dois homoterpenos o DMNT e o (*E,E*)-4,8,12-trimetoltrideca-1,3,7,11-tetraeno (TMTT). Na fase de fruto, destacaram-se os compostos, (*E*) ocimeno e o sesquiterpeno trans- α -bergamoteno. Adultos, machos, de *C. humeropictus* responderam preferencialmente aos odores liberados pelo cupuaçuzeiro na fenofase de frutificação. Tais respostas sugerem que as diferenças entre as proporções dos compostos liberados tenham sido suficientes para que machos de *C. humeropictus* distinguíssem os voláteis da fase de fruto. Os compostos (*E*) ocimeno e trans α -bergamoteno, α -copaeno, nonanal e DMNT foram os que mais contribuíram para o perfil de separação obtido na fase de frutos e possivelmente, podem estar envolvidos na atração da broca-do-cupuaçu.

Palavras chaves: semioquímicos, broca-do-cupuaçu, ecologia química.

Evaluation of the influence of volatiles of different structures (flower, fruit and leaf) of cupuassu on the search behavior of *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae).

SUMMARY

Plant volatiles are responsible for inducing numerous responses to insect behavior. This work had the objective to analyze the influence of the volatiles emitted by the cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum*, in different phenological stages on the search behavior of *Conotrachelus humeropictus*. The chemical analysis of the aeration extracts of the cupuaçuzeiro showed that there is difference in the composition of the volatile mixtures released in the phenological stages considered, flower, fruit and leaves. The class of compounds released in the different stages was similar being composed mainly of monoterpenes, sesquiterpenes and some aromatics. The major compounds found in the vegetative phase were sesquiterpenes (E, E) - α -farnesene and β -caryophyllene, β -myrcene monoterpenes, limonene and the (E) -4,8-dimethyl-1,3,7- nonatriene (DMNT). In the reproductive phase (flower), the major compounds were the monoterpenes (E) -ocimeno, the sesquiterpenos β -caryophyllene and (E, E) - α -farnesene and the two homoterpenes the DMNT and the (E, E) -4, 8,12-trimetoltrideca-1,3,7,11-tetraene (TMTT). In the fruit stage, the compounds were highlighted, (E) ocimene and sesquiterpene trans- α -bergamotene. Adult males of *C. humeropictus* responded preferentially to odors released by the cupuaçuzeiro in the phenological stages of fruiting. These responses suggest that the differences between the proportions of the released compounds were sufficient for males of *C. humeropictus* to distinguish the volatiles from the fruit phase. The compounds (E) ocimene and trans α -bergamotene, α -copaene, nonanal and DMNT contributed the most to the separation profile obtained in the fruit phase and possibly may be involved in the attraction of cupuassu.

Key words: semiochemicals, cupuassu fruit borer, chemical ecology.

3.1 INTRODUÇÃO

As substâncias químicas de natureza volátil produzidas pelas plantas têm sido consideradas de grande importância nas interações envolvendo plantas, pragas e inimigos naturais (VENDRAMIM, 2002). Normalmente, essas substâncias envolvem os álcoois, aldeídos, monoterpenos, sesquiterpenos e outras moléculas químicas, caracterizando o perfil de voláteis de uma planta, que pode sofrer alterações induzidas por influência de fatores bióticos e abióticos (TURLINGS et al., 1998; HARE, 2011). Embora sejam presentes em várias espécies de plantas, as características quantitativas e qualitativas dos perfis de voláteis parecem ser particulares (DICKE et al., 2000).

As plantas desenvolveram ao longo da evolução uma série de mecanismos que auxiliam na resistência aos herbívoros (DUDAREVA et al., 2006). As estratégias de defesa das plantas podem ser divididas em duas categorias: resposta de defesa constitutivas e respostas de defesa induzidas. As respostas de defesas constitutivas incluem mecanismos de defesa que estão sempre presentes e incluem inibidores de alimentação, toxinas e defesas mecânicas, no geral, são específicos para grupos taxonômicos. As respostas de defesas induzidas iniciam somente após a ocorrência do dano e incluem a modificação e o acúmulo dos metabólitos secundários da planta (LEVIN, 1973).

Os mecanismos de defesa direta podem alterar a biologia ou o comportamento de insetos herbívoros. Características morfológicas, no geral, agem negativamente sobre os insetos. Metabólitos secundários provocam ação repelente, supressora de alimentação e oviposição ou redutora de digestibilidade (ARIMURA et al., 2005; DICKE, 1994). A defesa indireta envolve a atração de inimigos naturais dos herbívoros que atacam a planta, por meio da produção de nectários extraflorais, domáceas e COVs (CHEN, 2008; HEIL, 2008).

A identificação e manipulação de semioquímicos mediadores de atividades vitais dos artrópodes oferecem uma ampla gama de possibilidades para o desenvolvimento de estratégias de controle de pragas mais sustentáveis, considerando-se que os sinais químicos são a fonte primária de informação para estes organismos. A identificação e o conhecimento das funções e natureza dos semioquímicos permite a manipulação com a finalidade do controle de pragas agrícolas, já apresentadas em casos bem sucedidos. Além disso, o conhecimento sobre a função dos voláteis emitidos em forma constitutiva nas interações

planta-herbívoro tem permitido o uso de plantas armadilhas e plantas repelentes na redução da pressão de pragas na cultura principal (SHRIVASTAVA et al., 2010).

Nos últimos anos, vários estudos têm sido conduzidos com o intuito de compreender a comunicação química existente entre plantas e insetos herbívoros, sendo que as substâncias envolvidas na comunicação entre estes organismos, por mediarem as interações intra e inter-específicas, possuem inúmeras possibilidades de uso no MIP. Nesse sentido, o uso de semioquímicos é um substituto potencial ou auxiliar aos métodos convencionais de controle e monitoramento populacional (BLASSIOLI-MORAES et al., 2016; VILELA; PALLINI, 2002; BORGES, et al., 2015).

A identificação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos pelas plantas e suas interações com os insetos, podem gerar novas tecnologias mais sustentáveis para serem aplicadas ao manejo integrado de pragas e minimizar o uso de agrotóxico. Os COVs podem atuar como atrativos ou repelentes, estimular ou inibir a alimentação, e até mesmo induzir ou prevenir o acasalamento de insetos (COOK et al., 2007; CERUTI, 2007). Eles também podem ser usados para atrair outros insetos benéficos tais como parasitoides e predadores. (DICKE; SABELIS, 1988, METCALF, 1998; HILKER; MEINERS, 2011, TEWARI et al., 2014).

Entre os exemplos melhor estudados das interações bióticas mediadas pelos COVs das plantas se encontra a atração dos insetos polinizadores. Segundo Cordeiro (2015), o Cambuci (*Campomanesia phae*), que é uma árvore frutífera nativa da Mata Atlântica, emite um buquê floral noturno que tem função atrativa para espécies de abelhas noturnas/crepusculares como *Megalopta* sp. O autor descreve que o volátil floral 1-octanol é o principal responsável por essa atração. Em outro estudo Cutri (2013) constatou que os compostos orgânicos voláteis que compõem o aroma das flores dos maracujazeiros (*Passiflora* spp.) contribuem para o sucesso reprodutivo destas espécies, uma vez que atuam fortemente na atração de polinizadores específicos, fundamentais para a produção dos frutos.

Abelhas por exemplo, são capazes de reconhecer as diferenças sutis na proporção dos compostos orgânicos voláteis florais emitidos por quatro cultivares de flores de dragão (*Antirrhinum majus*), que emitem os mesmos compostos voláteis, mas em diferentes proporções (WRIGHT et al., 2005). Em contraste com as abelhas, mariposas usam sugestões de odor em longas distâncias (DOBSON, 1994) e, portanto, a quantidade de odor tem que ser maior para ser detectado. Muitas mariposas podem usar os mesmos compostos para localizar fontes de néctar, embora as classificações de sensibilidade possam ser diferentes.

Os voláteis de planta induzidos por herbivoria (VPIHs) são sinais importantes na comunicação química entre plantas e insetos benéficos. No geral, são usados como sinônimos pelos inimigos naturais dos herbívoros (KAPLAN, 2012). Estudos vem mostrando que os VPIHs, poderiam ser liberados artificialmente no campo e utilizados pelos inimigos naturais como pistas de localização do hospedeiro (DRUKKER et al., 1995). Segundo Bernasconi et al. (2001) a densidade do predador no campo é sempre maior quando há infestação pela praga, e está associada aos VPIHs emitidos pelas folhas atacadas.

Os COVs podem ser utilizados dentro de um conceito de controle biológico conservativo (CBC) isto é, uma estratégia que busca preservar a população residente de inimigos naturais em uma plantação e aumentar a sua abundância e atividade. Os semioquímicos, neste caso, seriam utilizados para atrair estes inimigos naturais para a lavoura, enquanto que o sistema, plantas com flores (nectarias), forneceriam os nutrientes, para retenção dos inimigos naturais na área. Com isso haveria um aumento na longevidade e fecundidade dos inimigos naturais e retenção dos mesmos nas áreas de interesse, portanto, maximização da atividade sobre as pragas. (KHAN et al., 2008).

Os compostos orgânicos voláteis induzidos por sinais de *stress* emitidos pelas plantas além de atuarem na defesa indireta, atraindo os inimigos naturais, também agem na defesa direta das plantas repelindo os herbívoros (VENDRAMIM, 2002). Por outro lado, os voláteis induzidos e os compostos constitutivos das plantas também são usados como sinais pelos herbívoros para localizarem suas plantas hospedeiras (STEIDLE et al., 2001).

Estudos recentes sobre os semioquímicos responsáveis da interação entre a goiaba (*Psidium guajava* L.) e o bicudo da goiaba (*Conotrachelus psidii* Marshall, 1922) asseguram que a goiaba libera voláteis que são usados pelo bicudo de goiaba, para localizar a planta hospedeira. Foram estudados cinco fases fenológicas da goiaba (botão floral, flor aberta, flor seca, fruto imaturo e fruto) e os estudos mostraram o monoterpene como caioromônio para o *C. psidii* Marshall (FRÍAS, 2015).

Piñero e Prokopy (2003) ao avaliar resposta de *C. nenuphar* (gorgulho) a três voláteis sintéticos da ameixa, benzaldeído, isovalerato de etila e limoneno, avaliados isoladamente e em combinação com o ácido grandisoico, o feromônio de agregação de *C. nenuphar*, mostraram que o composto benzaldeído foi o único que teve sinergismo com o feromônio de agregação e que atraiu ambos os sexos da espécie.

Segundo a literatura, o uso combinado de voláteis da planta hospedeira com o feromônio de agregação dos insetos aumenta a eficiência de captura das armadilhas

feromonais (LANDOLT, 1997). Nesse contexto, combinar voláteis da planta hospedeira e feromônio em iscas para monitorar o início, pico e fim da migração de adultos de *C. humeropictus*, em pomares de cupuaçu, afim de precisar a tomada de decisão, pode ser uma ferramenta valiosa, (PIÑERO et al., 2001). Assim sendo, o objetivo desse capítulo foi analisar o perfil de voláteis produzidos pelo cupuaçuzeiro em diferentes estágios fenológicos e estudar a influência desses voláteis no processo de busca da planta hospedeira.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Local

As atividades de coleta de voláteis das plantas de cupuaçu, manutenção de insetos e bioensaios, foram desenvolvidas na área experimental de plantio de cupuaçu e no Laboratório de Entomologia da Embrapa Amazônia Ocidental. As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEM).

3.2.2. Obtenção das formas imaturas e adultos

Os insetos utilizados nos experimentos em laboratório foram obtidos durante a safra em plantações de cupuaçuzeiro da Estação Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental (Figura 1.1), situada no Km 29 da rodovia AM 010, no município de Manaus no Amazonas, latitude 2°53'S e longitude 59°58'W, nos anos de 2015, 2016 e 2017. Larvas (2000 mil) de quarto instar (ápodas, branco-leitosas, apresentando cápsula cefálica marrom-avermelhada e mandíbulas bem desenvolvidas, com cerca de 14 mm de comprimento), foram coletadas manualmente após a quebra de frutos infestados, recém caídos e recolhidos aleatoriamente sob a copa das árvores. Após a quebra dos frutos, as larvas foram contadas, separadas por tamanho e cor, mantidas em recipiente plástico transparente de 400 mL, com tampa perfurada, contendo em seu interior solo umedecido, para obtenção dos adultos.

Estes foram separados por sexo e mantidos individualmente em placas de Petri de plástico (60x15mm) em câmaras climatizadas (Eletrolab, São Paulo, Brasil), com temperatura

de 26 ± 2 °C e umidade relativa de 75 ± 10 % com fotoperíodo de 12:12 (fotofase/escotofase) até a emergência dos adultos (PAMPLONA; OLIVEIRA, 2013).

Os adultos foram mantidos em dieta natural composta por pedaços frescos de cana-de-açúcar, (aproximadamente 10 cm de comprimento do colmo repartido em quatro partes) trocados a cada dois dias. Especificamente, no ano de 2017, após constatação da presença de insetos adultos na copa das plantas de cupuaçu no campo, além do método descrito, os adultos foram coletados por método do sacolejo, segundo Trevisan (1989), no qual uma tela plástica, de cor branca com dimensões de 8,0 x 3,5 m foi estendida no chão, na projeção da copa da árvore que, em seguida, é sacodida com o auxílio de uma vara de madeira com 5,0 m de comprimento e um gancho na extremidade. Em função dos adultos apresentarem comportamento de tanatose quando se sentem ameaçados, eles são coletados no momento em que se lançam ao chão.

Após a coleta pelo método do sacolejo, os adultos foram transportados até o Laboratório de Entomologia da Embrapa Amazônia Ocidental, separados por sexo e mantidos em placas de Petri de plástico (60x15mm), em grupos de até 10 indivíduos em dieta de cana-de-açúcar.



Figura 1. 1 Área experimental utilizada para coleta de insetos e voláteis de plantas de cupuaçu. Estação Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, Km 29 da rodovia AM 010. Pomar Nagibão ($2^{\circ}53'17.39''S$; $59^{\circ}57'59.22''O$).

3.2.3. Período fenológicos do cupuaçuzeiro

Para determinar o perfil químico de voláteis emitidos em cada fase fenológica, foram selecionadas vinte plantas produtivas, distribuídas no pomar, com idade aproximada de vinte anos do banco de germoplasma de cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Ocidental na mesma área descrita acima (Figura 1.1). Os períodos fenológicos determinados foram: mudança foliar - maio-junho de 2016, floração - setembro-outubro de 2015 e frutificação - dezembro-janeiro de 2015 (PRANCE; SILVA, 1975; FALCÃO; LLERAS, 1983; FIGUEIRÊDO et al., 2002)

3.2.4. Coleta de voláteis

A coleta de voláteis foi realizada através da técnica de aeração, para isto, ramos com estruturas representativas de cada fase fenológica (folha, flor e fruto) foram selecionados e acondicionados no interior de sacos plásticos de poliéster (Reynold® - 59,6 cm de altura x 48,2 cm de base, USA) (Figura 1.2). Na fase de mudança foliar os ramos acondicionados continham apenas folhas, na fase de floração, folhas (em média oito folhas por ramo) e flores e na fase de fruto, apenas fruto. Sendo os frutos hospedeiros preferencias da broca para oviposição e desenvolvimento larval, priorizou-se na frutificação aerações com frutos acondicionados isoladamente no saco plástico, sem a presença de folhas ou demais estruturas, retiradas 24h antes da aeração. Os sacos plásticos antes do uso foram limpos com hexano e aquecidos à 120° C por 10 min. Os voláteis das estruturas selecionadas foram coletados a cada 24 h, durante três dias consecutivos. Um único sistema de aeração foi instalado em cada planta (Figura 1.2).

No sistema de aeração, o ar entrava no saco plástico por meio de uma bomba compressora com corrente de 1,0 L/min conectado a um filtro de carvão ativado (4-20 mesh), garantindo a entrada de ar purificado. A retirada do ar foi feita através de uma bomba de vácuo com vazão de 0,6 L/min, conectada a um tubo de vidro (10 x 150 mm) com 100 mg de polímero adsorvente Super Q® (80-100 mesh, Alltech PA, EUA). As conexões foram realizadas através de tubos flexíveis de politetrafluoretileno (PTFE), criando um sistema de pressão positiva, conforme descrito por Moraes et al., (2005) (Figura 2).



Figura 1.2 A - Sistema de aeração de plantas utilizado para coleta de voláteis no campo. B- detalhe dos frutos acondicionados no saco plástico. 1. Entrada do ar, 2 saída para a bomba de vácuo, onde é conectado o adsorvente para a coleta de voláteis.

Os voláteis adsorvidos no polímero foram eluídos usando 500 μL do solvente orgânico *n*-hexano, concentrados para 50 μL sob fluxo de N_2 . Os extratos de aeração foram armazenadas em freezer a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até serem usados nas análises químicas e nos bioensaios comportamentais.

3.2.5. Análises químicas dos compostos orgânicos voláteis do cupuaçuzeiro

Para as análises quantitativas dos compostos a cada amostra foi adicionada 1 μL do composto 16-hexadecanolactona, como padrão interno (PI), preparado em *n*-hexano destilado, a uma concentração final de $0,01\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para as análises, 1 μL de cada extrato de aeração foi injetado no CG (Agilent 7890B, coluna apolar DB-5MS, 0,25 mm de diâmetro x 60 m de comprimento e filme de 25,0 μm , Supelco, Bellefonte, PA, EUA), com detector de ionização de chama (DIC), usando o modo *splitless* e tendo o hélio como gás de arraste. A temperatura inicial da rampa foi de $50\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 min, aumentando gradualmente $5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até atingir $180\text{ }^\circ\text{C}$, onde foi mantida por 0,1 min, seguida de um segundo aumento gradual de $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até atingir $280\text{ }^\circ\text{C}$, permanecendo nessa temperatura por 10 min. A temperatura do detector foi de $270\text{ }^\circ\text{C}$ e do injetor, $250\text{ }^\circ\text{C}$.

A quantificação dos compostos liberados pelas plantas foi realizada por meio de comparação das áreas de cada composto em relação à área do PI. Desta forma, considerou-se o fator de resposta do detector, para todos os compostos, igual a 1. Os dados foram coletados com o software Chem Station e analisados com o programa Excel (Microsoft Office para Mac 2015, Microsoft Corporation, EUA).

Na avaliação qualitativa, amostras selecionadas foram injetadas no CG-EM (Agilent 5975MSD) equipado com analisador quadrupolar, e coluna apolar DB-5MS (0,25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento, com filme de 0,25 μ m, Supelco, Bellefonte, PA, EUA), com ionização por impacto de elétrons (70 eV, temperatura de 200°C) e injetor no modo *splitless*. O gás hélio foi usado como gás de arraste. Os dados foram coletados e analisados com o software Chem Station.

A identificação dos compostos orgânicos voláteis orgânicos foi realizada por comparação do padrão de fragmentação dos componentes da amostra com o de dados catalogados em bibliotecas espectrais (NIST e Wiley 2008), pelo cálculo do índice de retenção (IR) e confirmados pela injeção de padrões autênticos quando disponível. Para calcular o IR, uma mistura de hidrocarbonetos alcanos lineares (C9-C24) foi injetada nas mesmas condições descritas anteriormente.

Químicos: Acetato de isoamila, 2-heptanona, nonano, α -pineno, sabineno, β -pineno, decano, limoneno, 3-careno, e-ocimeno, γ -terpineno, 2-nonanona, linalol, 4,8-dimethylnona-1,3,7-triene (DMNT), dodecano, salicilato de metila, tridecano, α -copaeno, β -cariofileno, β -farneseno, (*E,E*)- α -farneseno e (*E,E*)-4,8,12-trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraene. Os outros compostos presentes nos extratos foram identificados através do padrão de fragmentação comparando com os dados da literatura e o índice de retenção.

3.2.6. Avaliação da atividade biológica dos voláteis do cupuaçuzeiro no comportamento de busca de *C. humeropictus*

Para avaliar se os voláteis liberados por plantas de cupuaçu, em diferentes fenofases tinham efeito sob o comportamento de adultos de *C. humeropictus*, foram conduzidos experimentos comportamentais em olfatômetro em “Y” utilizando os extratos obtidos na aeração como estímulos odoríferos. O olfatômetro em “Y” é uma placa de acrílico (26 x 23 cm), com uma cavidade em forma de “Y” (corpo 12 cm e braços 10,5 cm), mantida entre dois vidros de mesmas dimensões, um translúcido na parte inferior e o outro transparente na parte superior, prensados por cliques de papel (MORAES et al., 2005). Seringas de vidro (10 mL), contendo papel de filtro impregnado com 5 μ L dos extratos, foram conectadas a cada braço do olfatômetro através de mangueiras de silicone (Figura 1.3). Esperava-se 60 s para que o solvente evaporasse e somente então, era inserido o papel filtro nas seringas. No interior do olfatômetro, uma corrente de ar foi formada utilizando uma bomba de aquário com fluxo de

0,4 L/min. O ar conduzido para o interior do olfatômetro foi filtrado em carvão ativado, umidificado e regulado por fluxômetros. Para o escoamento do ar, uma bomba de sucção foi posicionada no extremo oposto à entrada de ar e regulada com fluxo de 0,4 L/min. Os testes foram conduzidos em sala climatizada (25 + 1°C e 70 + 10% UR) a partir das 18h, período de maior atividade do inseto (TREVISAN, et al., 2010).

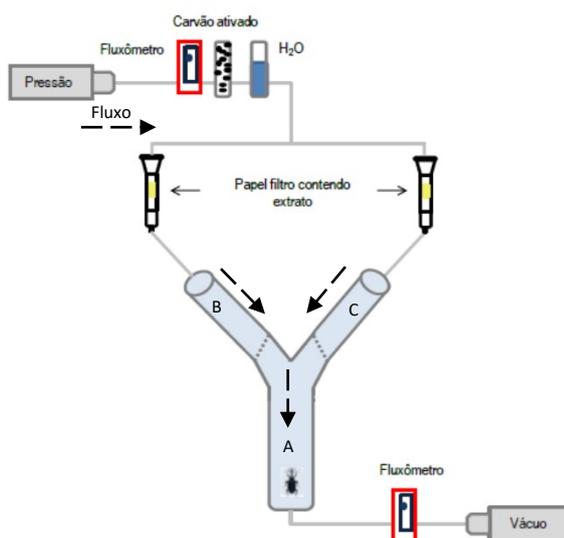


Figura 1. 3 Diagrama do sistema de bioensaios em olfatômetro em “Y” elaborado por Magalhães (2012) adaptado e adotado como referência para os bioensaios nesse estudo (Magalhães, 2012).

Neste sistema, um fluxo contínuo de ar umidificado e filtrado em carvão ativo atravessa os dois braços do tubo até a extremidade oposta (Sentido **B** e **C** para **A**) (Figura 1.3). No lado oposto, um único adulto, macho ou fêmea, da broca-do-cupuaçuzeiro foi introduzido na área de liberação do olfatômetro, no extremo oposto à corrente de ar, e seu padrão de procura foi registrado durante dez minutos. Foram considerados como não responsivos os insetos que não se movimentavam nos primeiros 5 min de observação. Foi avaliado a primeira escolha (que é o primeiro braço do olfatômetro que o inseto entrou e permaneceu pelo menos 20 s). Cada adulto foi usado apenas uma vez e os filtros de papel contendo os extratos foram trocados a cada cinco repetições, quando a posição dos braços foi invertida entre tratamento.

Os insetos utilizados nos bioensaios foram provenientes da criação estoque do laboratório, com idades variando entre 30 a 120 dias. Para avaliar o padrão de resposta de adultos de *C. humeripictus*, machos e fêmeas para odores das plantas de cupuaçu foram

avaliados os seguintes tratamentos, 1) extrato de aeração de planta na fenofase de mudança foliar x hexano, 2) extrato de aeração de planta na fenofase de floração x hexano, 3) e extrato de aeração de planta na fenofase de frutificação x hexano. Foram realizadas 30 repetições para cada tratamento.

3.2.7. Análises estatísticas

Respostas dos machos e fêmeas nos bioensaios foram analisadas pelo teste Qui-Quadrado. Para hipótese nula foi considerada de 95% de confiança.

A quantidade total de voláteis emitidos em cada fenofase foi analisada por análise de variância (ANOVA). O contraste foi realizado efetuando-se a comparação das médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Todos os dados foram analisados com o programa R 2.14.0 (R Development Core Team, 2009) com nível de significância de $p < 0.05$.

Para determinar a contribuição de cada composto para o perfil de separação dos tratamentos em cada tempo avaliado, foram realizadas análises de Variáveis Canônicas (AVC). Os dados foram analisados com o programa PAST 2.17c, 2013. Esta análise discriminante fornece uma representação gráfica das variáveis que mais contribuíram para os níveis de agrupamento dos compostos.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Análise química dos compostos orgânicos voláteis

As análises químicas dos extratos de aeração das plantas do cupuaçuzeiro mostraram que há diferença na composição das misturas liberadas nas três fenofases, com 33 compostos orgânicos voláteis identificados (Figura 1.4). A mistura de voláteis é composta por uma série de monoterpenos, sesquiterpenos e alguns aromáticos. Os compostos majoritários encontrados na fase de mudança foliar foram os sesquiterpenos (*E,E*)- α -farneseno e β -cariofileno, os monoterpenos β -mirceno e o limoneno e o homoterpeno (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT). Na fase reprodutiva (flor) os compostos majoritários foram o monoterpeno, (*E*)-ocimeno, os sesquiterpenos β -cariofileno e (*E,E*)- α -farneseno, e dois homoterpenos, DMNT e (*E,E*)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno (TMTT). Na frutificação, destacaram-se a produção do monoterpeno, o (*E*)-ocimeno e do sesquiterpeno trans- α -bergamoteno (Tabela 1). A identidade dos voláteis está de acordo com os compostos previamente encontrados em outros estudos com cupuaçu (BORGES et al., 2015). Quantitativamente os voláteis emitidos pelas plantas diferiu entre as fases fenológicas ($F=10,95$, $p<0,001$; teste Tukey $p<0,05$) (Figura 4). O maior número de compostos foi detectado no período reprodutivo (Figura 1.5). No geral, a mistura mais abundante de COV é liberada pelas flores (MARÍN-LOAIZA; CÉSPEDES, 2007; PINTO-ZEVALLOS et al., 2013). Segundo esses autores, é durante a floração que acontece uma importante liberação de voláteis produzida pela planta para atrair polinizadores. Segundo Lafleur; Hill (1987) em *C. nenuphar* a migração para a planta hospedeira é sinalizada por esta fase fenológica, é o momento em que a planta se torna mais notável do ponto de vista olfativo.

A menor quantidade de voláteis liberada pelo cupuaçuzeiro foi observada na frutificação seguida pela fenofase de mudança foliar (vegetativa) (Figura 1.4). Normalmente folhas e outros tecidos vegetativos como frutos liberam uma quantidade pequena de compostos orgânicos voláteis. O estágio de desenvolvimento do órgão (ontogenia foliar, floral e do fruto) é muitas vezes determinante na quantidade e na composição de voláteis de plantas. Em muitos casos ocorre uma alteração da composição química, sendo que alguns componentes podem variar das fases iniciais ao completo desenvolvimento do órgão (FIGUEIREDO et al., 1997; MÁÑEZ et al., 1991; BADALAMENTI, 2004).

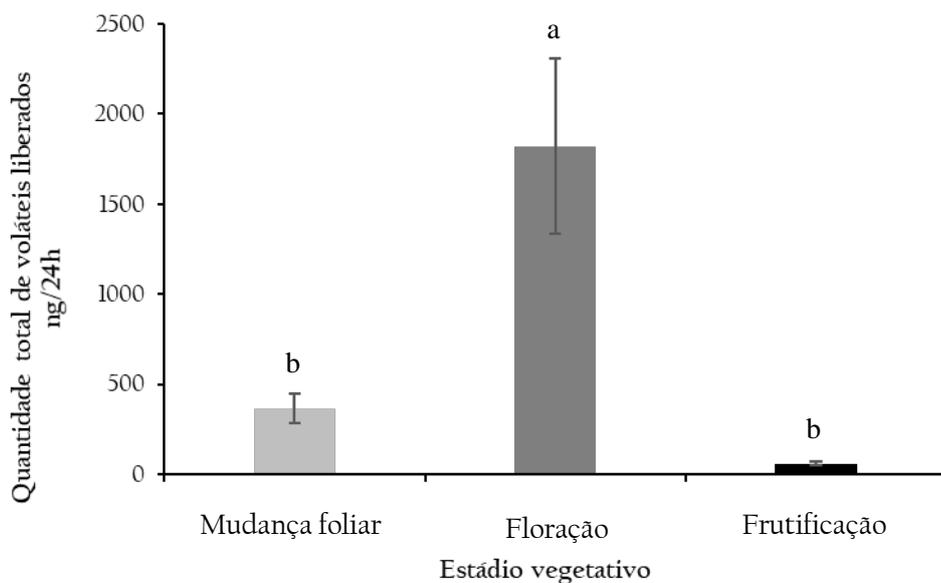


Figura 1. 4 Compostos orgânicos voláteis totais (média + EP) liberados por plantas de cupuaçuzeiro nas fenofases de mudança foliar, floração e de frutificação. Médias seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

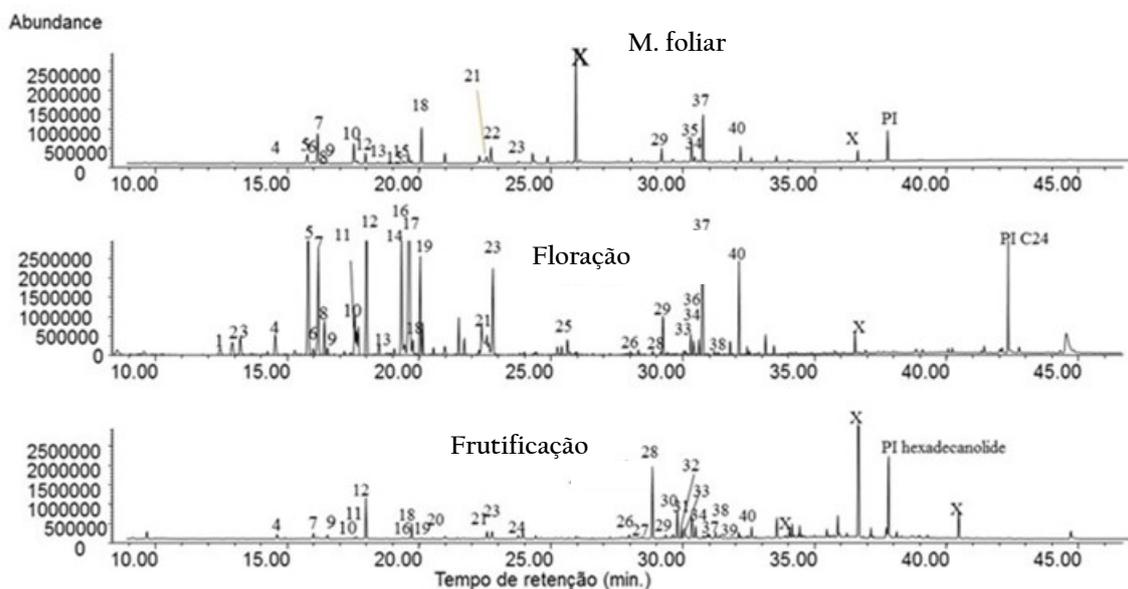


Figura 1. 5 Perfis cromatográficos de plantas de cupuaçuzeiro nas fenofases de mudança foliar (M. foliar), floração e frutificação. PI: padrão interno. Números correspondem aos compostos da Tabela 1.

Tabela 1 Compostos orgânicos voláteis coletados de plantas de cupuaçuzeiro em diferentes fenofases (média + erro padrão da média em µg no intervalo de 24h).

Compostos*	µg/24h		
	Mudança foliar	Floração	Frutificação
1. Isoamil acetato	-	59.48 ± 16.19	-
2. 2-Heptanona	-	48.62 ± 16.11	-
4. α-Pineno	35.68 ± 14.24	45.79 ± 20.97	37.87 ± 8.93
5. Sabineno	179.32 ± 87.35	168.37 ± 142.00	-
6. β-Pineno	-	52.24 ± 7.34	-
7. β-Mirceno	366.99 ± 126.31	222.38 ± 74.89	56.04 ± 18.33
9. Octanal	58.69 ± 21.45	135.08 ± 18.93	95.28 ± 14.75
10. Limoneno	317.62 ± 104.25	248.04 ± 56.79	58.59 ± 10.11
11. (Z) Ocimeno	-	10.48 ± 2.61	82.85 ± 30.46
12. (E) Ocimeno	244.41 ± 79.08	1521.89 ± 440.11	514.68 ± 272.61
13. γ-Terpineno	33.37 ± 13.15	17.23 ± 2.45	-
14. 2-Nonanona	-	130.2 ± 46.81	-
15. Terpinoleno	75.18 ± 16.79	-	-
16. Linalol	105.53 ± 30.71	363.54 ± 119.11	126.55 ± 43.33
18. Nonanal	155.65 ± 44.19	225.31 ± 32.73	291.67 ± 54.43
19. DMNT	354.68 ± 123.77	882.82 ± 358.56	140.16 ± 92.19
20. Alocimeno	-	-	6.43 ± 2.54
23. Salicilato de metila	80.1 ± 28.08	208.61 ± 30.40	69.29 ± 20.73
24. Benzotiazol	114.9 ± 38.59	75.13 ± 23.99	47.9 ± 10.49
26. α-Copaeno	-	84.46 ± 18.26	149.41 ± 47.01
27. cis α-bergamoteno	-	38.84 ± 6.39	19.38 ± 5.03
28. trans α-bergamoteno	-	-	526.21 ± 138.48
29. β-Cariofileno	327.7 ± 116.13	334.09 ± 168.41	100.44 ± 25.28
30. Sesquiterpeno (fruto)†	-	-	24.16 ± 6.27
31. Sesquiterpeno (fruto)†	-	-	6.43 ± 2.54
32. (Z)- β-farneseno	-	-	35.6 ± 8.61
33. (E)- β-farneseno	-	-	83.43 ± 23.08
35. Germacreno D (folha)	77.73 ± 42.76	-	-
36. Sesquiterpeno (flor)	-	247.21 ± 70.03	-
37. (E,E)-α-Farneseno	381.05 ± 135.63	3678.07 ± 1117.15	-
38.cis-α-Bisaboleno	-	-	22.35 ± 13.53
39. β-Bisaboleno	-	-	35.12 ± 7.80
40. TMTT	128.77 ± 55.13	807.54 ± 278.46	69.26 ± 26.49

1 Valores médios (± EPM) calculados a partir de 20 amostras obtidas na aeração das plantas de cupuaçuzeiro no intervalo de 24 h. †Tentativa de identificação dos compostos. *Os compostos 3,8, 17, 21, 22, 25 e 34 ausentes na tabela, representam hidrocarbonetos alcanos lineares (C9-C24) injetados para calcular IR.

Como a produção de compostos nas plantas ocorre através de rotas biossintéticas a quantidade de compostos sendo produzidas não é uma variável independente (HARE, 2011), assim sendo optou-se por aplicar uma técnica estatística para análise de dados multivariada que considera a dependência dos dados.

A análise de Variáveis Canônicas (AVC) mostrou diferenças no padrão de agrupamento dos voláteis de plantas de cupuaçuzeiro entre as fenofases. (MANOVA teste de Pillai-trace: (24 h) $F=7,036$, $p=0,001$; (Figura 1.6). É possível observar três grupos: o primeiro representado pela fenofase de mudança foliar (folha), o segundo pela fenofase de floração (reprodutivo) e o terceiro pela fenofase de frutificação. Os compostos mirceno (7) e limoneno (10) parecem estar correlacionados com a fenofase de mudança foliar (folha). Os compostos (E)-ocimeno (12), DMNT (19), (E,E)- α -farneseno (37) e TMTT (40) parecem estar fortemente correlacionados com a fase reprodutiva (flor) e o *trans*- α -bergamoteno (28) com a fase de frutificação (Figura 1.6, Tabela 1).

Estes compostos já foram relacionados a diversos papéis semioquímicos, portanto, essenciais na comunicação entre os seres vivos (GATEHOUSE, 2002). Estudos sobre o efeito do dano herbívoro em cultivares de plantas resistentes e susceptíveis sobre seus inimigos naturais, constatou que os compostos (E,E)- α -farneseno, salicilato de metilo, acetato de (Z)-3hexenilo e (E)-2-octen-1-ol., foram os que mais contribuíram para a divergência entre plantas de soja danificadas em comparação com plantas não danificadas (MICHEREFF et al., 2011).

Pavarini e Lopes (2016) relatam que nos campos da ecologia química e da fisiologia vegetal o estudo das terpeno sintases e das repostas nos níveis de seus produtos, os terpenos voláteis principalmente, têm avançado no sentido de reforçar os papéis semioquímicos destes metabolitos principalmente no nível trófico de comunicação “planta-inseto” implicando, portanto, que há aquisição evolutiva dos organismos que biossintetizam estes compostos.

Ademais, estas funções semioquímicas ocorrem em interações multitróficas, mediando relações de organismos vivos pertencentes a diferentes níveis hierárquicos na teia alimentar. Segundo Xiao et al. (2012), voláteis induzidos por herbívoros específicos defendem plantas e determinam a composição da comunidade de insetos no campo. Esses autores constataram em arroz a atração dos predadores e parasitóides de herbívoros por emissão de β -cariofileno em ação sinérgica com a emissão de linalol induzida por ataque. Como agente gerador de uma resposta de defesa por mecanismo indireto é possível citar ainda a ação atrativa que o (E)- β -cariofileno produz sobre nematoides entomopatogênicos. As raízes

de milho liberam este sesquiterpeno em resposta à alimentação por larvas do besouro *Diabrotica virgifera*, uma praga de milho encontrado na Europa (RASMANN et al., 2005).

A maior contribuição para o perfil de separação na frutificação, foi a produção de *trans- α -bergamoteno*. A mudança no perfil químico da planta com o fruto, onde ocorre a diminuição na produção de alguns voláteis como os homoterpenos DMNT e TMTT e aumento na produção de sesquiterpenos (Tabela 1), deve ser uma informação importante para *C. humeropictus* que as plantas já alcançaram o estágio de frutificação. Magalhães et al. (2016), mostrou que plantas de algodão ao atingirem o estágio reprodutivo e começarem emitir os primeiros botões tem a produção de TMTT e DMNT diminuída em relação as plantas no vegetativo e que o bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* utiliza esses sinais químicos como indicativo que as plantas estão no estágio fenológico para o seu acasalamento e oviposição.

Diferenças fenológicas podem resultar em mudanças na liberação de voláteis. A emissão de voláteis varia quali- e quantitativamente, a depender de uma série de fatores que interagem entre si, como a própria fenologia da planta e a guilda alimentar dos insetos que a ataca (KALINOVÁ et al., 2000). Uma maior quantidade de voláteis emitidos não implica, necessariamente, em maior atratividade de insetos. Estudos sobre semioquímicos de plantas de algodoeiro induzidos por herbivoria de *Anthonomus grandis*, revelaram que o algodoeiro no estágio vegetativo liberou determinados compostos em maior quantidade do que no estágio reprodutivo, o que não garantiu maior atração para o *A. grandis*. Dessa forma, mesmo liberando uma mistura de compostos orgânicos voláteis em menor quantidade, o algodoeiro, quando reprodutivo, atraiu mais o *A. grandis* (MAGALHÃES et al., 2012).

Os resultados revelam que o cupuaçuzeiro apresenta diferenças no perfil de voláteis emitidos por plantas em fenofases diferentes e, *Conotrachelus humeropictus* discrimina cupuaçuzeiros por fases fenológicas por meio das diferenças no perfil de voláteis emitidos por plantas (Figura 1.5, figura 1.6).

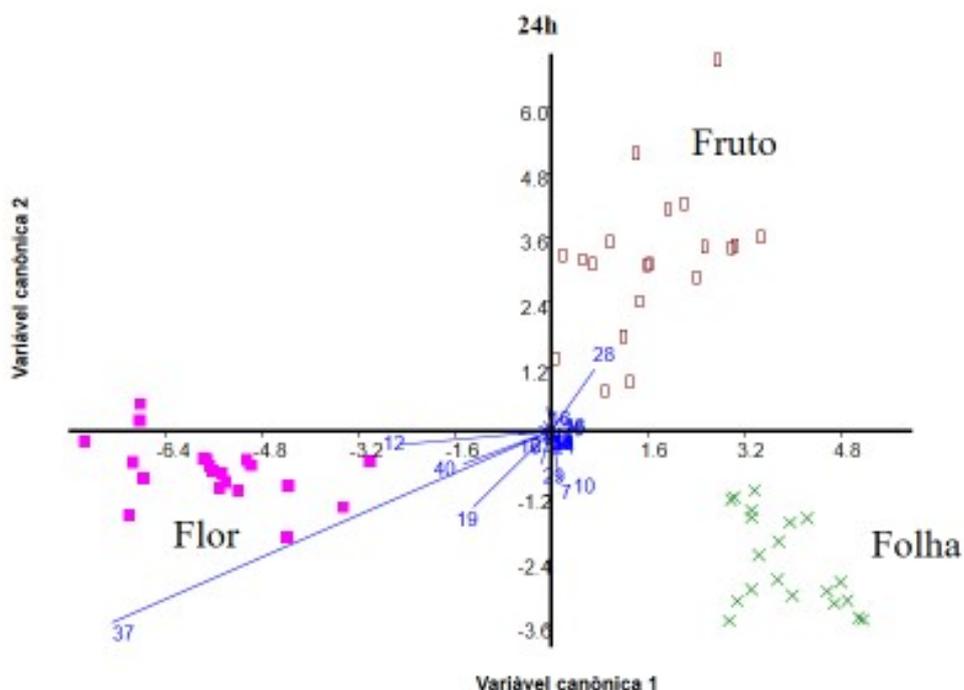


Figura 1. 6 Análise de Variáveis Canônicas (AVC) indicando a composição dos voláteis de plantas de cupuaçuzeiro em diferentes fenofases. Os símbolos representam os *scores* individuais para cada amostra, calculados a partir da AVC que maximiza as diferenças entre os tratamentos nas duas dimensões consideradas (CV1 e CV2). As linhas azuis representam os diferentes compostos presentes nas amostras e seu comprimento, a importância (magnitude relativa) da contribuição de cada composto para a diferenciação das fenofases. Floração, frutificação e mudança foliar. Os números representam os compostos 1) Isoamil acetato, 2) 2-heptanona, 4) alpha-pineno, 5) sabineno, 6) beta pineno, 7) mirceno, 9) octanal, 10) limoneno, 11) (Z)-ocimeno, 12) (E)-ocimeno, 13) γ -terpineno, 14) 2-nonanona, 15) terpinoleno, 16) linalol, 18) nonanal, 19) DMNT, 20) alocimeno, 23) salicilato de metila, 24) benzotiazol, 26) α -copaeno, 27) cis- α -bergamoteno, 28) trans- α -bergamoteno, 29) β -cariofileno, 30) sesquiterpeno (fruto), 31) sesquiterpeno (fruto), 32) (Z)- β -farneseno, 33) (E)- β -farneseno, 35) germacreno D (Folha) 36) sesquiterpeno (flor), 37) (E,E) α -farneseno, 38) cis- α -bisaboleno, 39) β -bisaboleno e 40) TMTT .

3.3.2. Bioensaios com adultos de *C. humeropictus*

Os insetos que não escolheram nenhum dos lados do olfatómetro, não foram considerados na análise estatística. Os adultos utilizados foram do campo, recém coletados pelo método do sacolejo e alimentados exclusivamente com cana-de-açúcar. Apenas machos de *C. humeropictus* responderam preferencialmente à extratos de aerações das plantas do

cupuaçuzeiro na frutificação. É provável que nesta fase os machos ao chegarem na planta hospedeira anunciem, a sua presença para as fêmeas, indicando uma fonte de alimento disponível nas proximidades para alimentação e oviposição, aumentando suas possibilidades de atrair e acasalar (LANDOLT; PHILLIPS, 1997). Nos demais bioensaios não foram observadas respostas significativas, as fenofases mudança foliar e reprodutivo representam os menos atraentes (Figura 1.7). Machos respondendo para extratos de aeração de plantas na fenofase de mudança foliar versus hexano ($\chi^2 = 0.533$, $p = 0.465$), machos respondendo para extratos de aeração de plantas na fenofase de floração versus hexano ($\chi^2 = 0.533$, $p = 0.465$), machos respondendo para extratos de aeração de plantas na fenofase de frutificação versus hexano ($\chi^2 = 4.551$, $p = 0.033$), fêmeas respondendo para extratos de aeração de plantas na fenofase de mudança foliar versus hexano ($\chi^2 = 0.533$, $p = 0.465$), fêmeas respondendo para extratos de aeração de plantas na fenofase de floração versus hexano ($\chi^2 = 2.133$, $p = 0.144$), fêmeas respondendo para extratos de aeração de plantas na fenofase de frutificação versus hexano ($\chi^2 = 1.125$, $p = 0.288$).

Estudos sobre respostas de *C. nenuphar* à voláteis de plantas hospedeiras (ameixa e maçã), ácido grandisoico e odor de macho vivos, constataram que a maior atração de fêmeas ocorreu quando maduras, alimentadas e virgens (HOCK et al., 2017). Esse fato ressalta a importância dos fatores fisiológicos da espécie nos bioensaios de atratividade. É possível que os testes não responsivos neste trabalho estejam ligados ao estado fisiológico dos insetos utilizados.

A essência da ameixa (planta hospedeira) é considerada altamente atrativa para *C. nenuphar* em teste de campo (COOMBS 2001; WHALON et al., 2006; AKOTSEN-MENSAH et al., 2010). A atratividade de machos de *C. humeropictus* aos voláteis liberados especificamente na frutificação sustentam que a essência dos frutos são atrativos a estes insetos. Indicando a possível utilização dos voláteis de cupuaçu em iscas atrativas em armadilhas para monitoramento da broca.

Os resultados encontrados neste trabalho assemelham-se aos de Hock et al. (2017), Leskey e Prokopy (2001) e Akotsen-Mensah (2010), sugerindo que assim como o curculio da ameixa, a broca-do-cupuaçu também é essencialmente atraída para voláteis de frutas (estádio de frutificação), indicando a importância de odores de frutas como componentes-chave em iscas de armadilha.

Tais respostas sugerem que as diferenças entre as proporções dos compostos liberados tenham sido suficientes para que machos de *C. humeropictus* distinguíssem os voláteis da fase de fruto. No entanto, a função individual e/ou conjunta destes compostos ainda precisa ser avaliada, afim de esclarecer o mecanismo de comunicação química no sistema *Conotrachelus*-cupuaçuzeiro. Nesse sentido, esse estudo identificou o perfil químico de voláteis produzidos por plantas de cupuaçu e que as mudanças na proporção dos compostos e produção de sesquiterpenos e homoterpenos podem estar relacionados com a atratividade de *C. humeropictus*. Estudos futuros usando eletroantenografia e soluções sintéticas dos compostos poderiam comprovar essa hipótese, em direção à identificação dos semioquímicos envolvidos na provável atração da broca pela planta hospedeira.

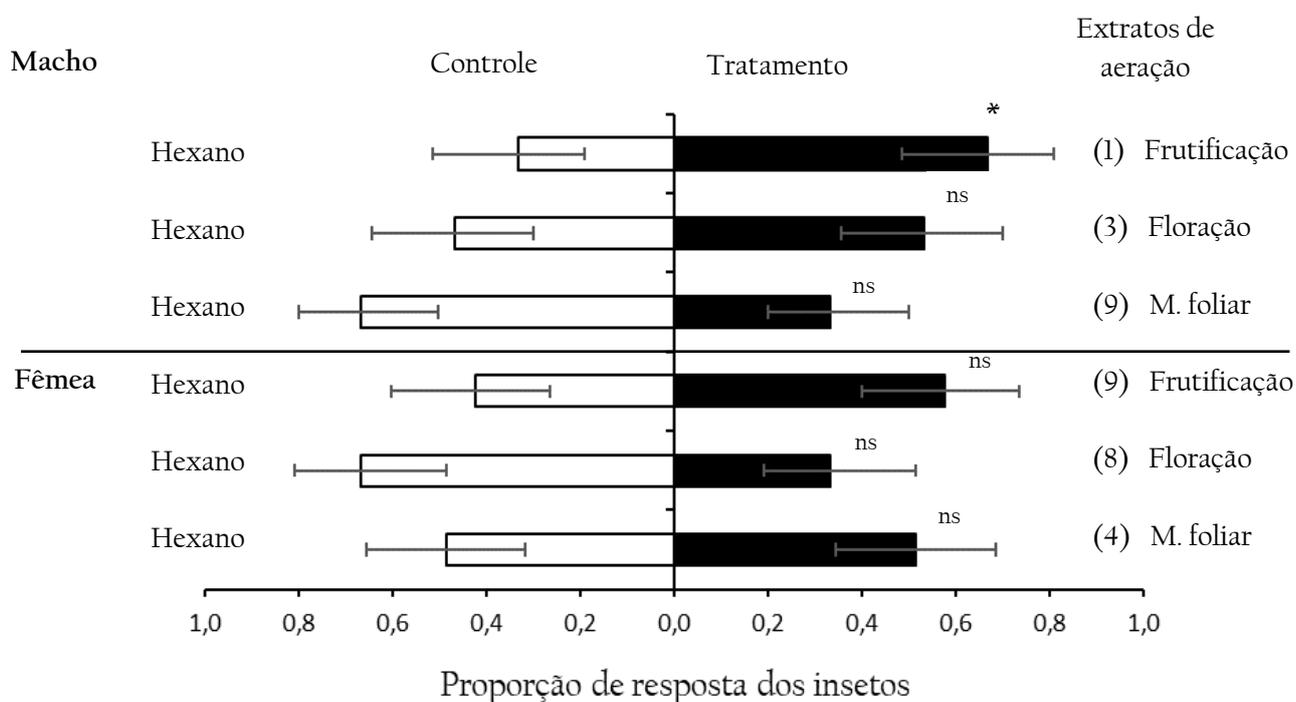


Figura 1. 7 Resposta da primeira escolha de machos e fêmeas adultos do campo de *Conotrachelus humeropictus* para extratos de aeração (24h) de cupuaçuzeiro em três fenofases (mudança foliar, floração e frutificação) no olfatômetro em “Y”. Controle: hexano. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), onde: *, $0,05 > p > 0,01$. Números entre parentes representam os bioensaios com insetos que não responderam aos estímulos odoríferos. A primeira escolha foi analisada por Regressão Logística; X^2 e teste de Wald para avaliar a significância. Barras representam o IC a 95%.

3.2. CONCLUSÕES

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) apresentou um perfil de voláteis quantitativamente diferente nas fenofases avaliadas. Preferencialmente, a broca-do-cupuaçu responde aos voláteis de plantas de cupuaçu na fenofase de frutificação.

É provável que o recrutamento de novos indivíduos (os primeiros, em infestação inicial) à cultura do cupuaçuzeiro seja estimulado pelo sinergismo do “compostos químicos específicos” com voláteis emitidos por plantas de cupuaçuzeiro, preferencialmente na frutificação.

Um alternativa para a captura dos adultos em armadilhas no campo seria a utilização de lures (iscas atrativas) sintéticos com essência do fruto e o feromônio da broca (feromônio + cairomônio).

A seleção de variedades de cupuaçu que produzam quantidades altas de DMNT e TMTT ou mesmo colocar os voláteis da fenofase de mudança foliar em grande quantidade nos lures em tese, seria uma estratégia para enganar a broca para ela não perceber que o cupuaçu entrou no estágio reprodutivo e assim evitar a chegada no pomar.

Estudos de natureza atrativa ou sinergista com os compostos químicos do cupuaçuzeiro merecem investigação. A apreciação individual dos compostos com potencial de atração da broca, α -farneseno, β -mirceno, DMNT, limoneno, (*E*)-ocimeno, β -cariofileno, DMNT, TMTT, (*E,E*)- α -farneseno, (*E*)-ocimeno e trans- α -bergamoteno, além de ensaios comportamentais e testes eletrofisiológicos podem auxiliar na caracterização do(s) composto(s) envolvido(s) na atração da broca por sua planta hospedeira, resultando em avanços técnicos para o controle desta praga.

REFERÊNCIAS

- AKOTSEN-MENSAH, C.; BOOZER, R.; FADAMIRO, H. Y. Field evaluation of traps and lures for monitoring plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in Alabama Peaches. *J Econ Entomol.* 103(3):744–753, 2010.
- ARIMURA, G.; KOST, C.; BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defense. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1734: 91-111, 2005.
- BADALAMENTI, F. Changes in lemon oil composition during fruit ripening. In: Proceedings of the IFEAT International Conference 2004 – The essential oils of the Mediterranean region. Green C (Ed.). p. 77-97. IFEAT, UK.
- BERNASCONI, M. L.; TURLINGS, T. C. J.; EDWARDS, L. J.; Fritzsche-Hoballah, m. e.; Ambrosetti, I.; Bassetti, p.; Dorn, s. Response of natural populations of predators and parasitoids to artificially induced volatile emissions in maize plants (*Zea mays* L.) *Agricultural and Forest Entomology*, 3, 201-209. 2001.
- BLASSIOLI-MORAES, M. C.; BORGES, M.; LAUMANN, R. A.; MAGALHÃES, D. M.; VIANA, A. R.; MIRANDA, J. E.; BIRKETT, M. Semiochemicals from plants and insects on the foraging behaviour of natural enemies. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* (Online), v. 51, p. 454-464, 2016.
- BORGES, M.; BLASSIOLI-MORAES, M. C.; LAUMANN, R. A. Ecologia química aplicada a agropecuária. In: 61ª Reunião Anual da Sociedade Interamericana de Horticultura Tropical, 2015, Manaus. Livro de resumo da 61ª Reunião Anual da Sociedade Interamericana de Horticultura Tropical, 2015. v. 1. p. 51-54.
- BORGES, MIGUEL; BLASSIOLI-MORAES, M. C.; LAUMANN, R. A.; CLARET, A. Estudo das interações entre o cupuaçuzeiro e o curculionídeo *Conotrachelus humeropictus* MEDIADAS POR SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS. In: 61ª Reunião Anual da Sociedade Interamericana de Horticultura Tropical, 2015, Manaus. Livro de resumo da 61ª Reunião Anual da Sociedade Interamericana de Horticultura Tropical, 2015. v. 1. p. 94-95.
- CERUTI, F. C. Interações entre feromônios de insetos e semioquímicos de plantas. *Rev. Acad.*, Curitiba, 5(1), 73-82, 2007.
- CHEN, M.S. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Science*, 15: 101-114, 2008.
- COOK, S. M.; KHAN, Z. R.; PICKETT, S. A. The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 375–400, 2007.
- COOMBS, A. Trap designs and attractants for monitoring plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst). M.Sc. Dissertation. Michigan State University, East Lansing, p 214 2001.
- CORDEIRO, G. D. Fenologia reprodutiva, polinização e voláteis florais do Cambuci (*Campomanesia phae* (O. Berg) Landrun 1984 – Myrtaceae). 2015. 89 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

CUTRI, L. O aroma das flores de *Passiflora* spp. na atração de polinizadores: uma abordagem bioquímica e molecular. 2013. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DICKE, M.; SABELIS, M. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds. *Functional Ecology*, 2, 131–139, 1988.

DICKE, M. Local and systemic production of volatile herbivore-induced terpenoids: their role in plant-carnivore mutualism. *Journal of Plant Physiology*, 43: 465-472, 1994.

DICKE, M.; SCHUTTE, C.; DIJKMAN, H. Change in behavioral response to herbivore-induced plant volatiles in a predatory mite population. *Journal of Chemical Ecology*, New York, v. 26, p. 1497-1514, 2000.

DOBSON, H. E. M. Floral volatiles in insect biology. In: *Insect-plant interactions Vol. V*. pp. 47–81. 1994. Bernays, E., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL.

DRUKKER, B.; SCUTAREANU, P.; SABELIS, M. W. Do anthocorid predators respond to synomones from *Psylla*-infested pear trees under field conditions? *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Dordrecht, v. 77, n. 2, p. 193-203, 1995.

DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D.A.; ORLOVA, I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25, 417–440, 2006.

FALCÃO, M.A.; LLERAS, E. Aspectos fenológicos, ecológicos e de produtividade do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd ex Spreng Schum). *Acta Amazônica*, v.13, n.5/6, p.725-735, 1983.

FIGUEIRÊDO, F.J.C.; FERREIRA, C. DA S.; DA ROCHA NETO, O. G. Aspectos biofísicos de cupuaçuzeiros cultivados ao sol e à sombra. Embrapa Amazônia Oriental. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 2002.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHEFFER, J. J. C. Physiological aspects of essential oil production. In: *Essential Oils: Basic and Applied Research*, FRANZ, C. H.; MÁTHÉ, A.; BUCHBAUER (EDS), pp. 95-107, 1997. Proceedings of the 27th International Symposium on Essential Oils, Allured Publishing Corp., Carol Stream, IL.

FRÍAS, R.; ADELA, ALICIA. O estudo dos semioquímicos responsáveis da interação entre a guayaba (*Psidium guajava* L) e o picudo da guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall. 2015. Tesis de Doctorado em Ciências Químicas. Universidad Nacional de Colômbia, Bogotá, Colômbia, 2015.

GATEHOUSE, J. A. Plant resistance towards insect herbivores: A dynamic interaction. *New Phytol.* 156: 145–169, 2002.

HARE, J. D. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. *Annual Review of Entomology*, 56: 161-180, 2011.

HEIL, M. Indirect defense via tritrophic interactions. *New Phytologist*, 178: 41-61, 2008.

HILKER, M.; MEINERS, T. Plants and insect eggs: how do they affect each other. *Phytochemistry*, 72, 1612–1623, 2011.

HILKER, M.; MEINERS, T. 2006. Early herbivore alert: insect eggs induce plant defense. *Journal of Chemical Ecology*, 32: 1379-1397.

- HOCK, V.; CHOUINARD, G.; LUCAS, É.; CORMIER, D.; LESKEY, T.; ZHANG, A. Olfactometer Responses of Plum Curculio *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) to Host Plant Volatiles, Synthetic Grandisoic Acid, and Live Conspecifics. *J Insect Behav.* 30: 475, 2017.
- KALINOVA, B.; STRANSKY, K.; HARMATHA, J.; CTVRTECKA, R.; ZD'AREK, J. Can chemical cues from blossom buds influence cultivar preference in the apple blossom weevil (*Anthonomus pomorum*)? *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 95: 47-52, 2000.
- KAPLAN, I. Attracting carnivorous arthropods with plant volatiles: the future of biocontrol or playing with fire? *Biological Control*, v. 60, n. 2, p. 77-89, 2012.
- KHAN, Zeyaur R.; et al., Chemical ecology and conservation biological control. *Biological Control*, v. 45, n. 2, p. 210-224, 2008.
- LAFLEUR, GERALD; HILL, STUART B. Spring migration, within-orchard dispersal, and apple-tree preference of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in southern Quebec. *Journal of Economic Entomology*, v. 80, n. 6, p. 1173-1187, 1987.
- LANDOLT, P. J. Sex attractant and aggregation pheromones of male phytophagous insects. *Am. Entomol.* 43: 12-21, 1997.
- LANDOLT, P. J.; PHILLIPS, T. W. Host plant influences on sex pheromone behaviour of phytophagous insects. *Annu Rev Entomol* 42:371–391, 1997.
- LESKEY, T. C., R. J. PROKOPY, S. E. WRIGHT, P. L. PHELAN, AND L. W. HAYNES. Evaluation of individual components of plum odor as potential attractants for adult plum curculios. *J. Chem. Ecol.* 27: 1-17, 2001.
- LEVIN, D.A. The role of trichomes in plant defense. *Quart. Rev. Biol.*, v. 48, p. 3-15, 1973.
- MAGALHÃES, D. M., BORGES, M., LAUMANN, R. A., SUJII, E. R., MAYON, P., CAULFIELD, J. C. Semiochemicals from herbivory induced cotton plants enhance the foraging behaviour of the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Journal of Chemical Ecology*, 38: 1528–1538, 2012.
- MÁÑEZ, SALVADOR; JIMÉNEZ, ADELA; VILLAR, ANGEL. Volátiles de *Sideritis mugronensis* flor e folha. *Journal of Essential Oil Research* , v. 3, n. 6, p. 395-397, 1991.
- MARÍN-LOAIZA, J.; CÉSPEDES, C. Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Revista Fitotecnia Mexicana.*, 30, 327–351, 2007.
- METCALF, R. Ultramicrochemistry of insect semiochemicals. *Mikrochimica Acta*, 129, 167–180, 1998.
- MICHEREFF, M. F. F.; LAUMANN, R. A.; BORGES, M., MICHEREFF-FILHO, M., DINIZ, I. R.; NETO, A. L. F.; AND MORAES, M. C. B. Volatiles mediating a plant-herbivore –natural enemy interaction in resistant and susceptible soybean cultivar. *J. Chem. Ecol.* 37:273–285, 2011.

- MORAES, M. C. B.; SOUSA, L. M. P. DE; LAUMANN, R. A.; BORGES, M. Metodologia para estudos de semioquímicos e sua aplicação no manejo de pragas. A influência de voláteis de soja no comportamento do parasitóide *Telenomus podisi*. Brasília - DF: Embrapa recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005 (Circular Técnica No. 24).
- PALACIO-CORTÉS, A. M.; VALENTE, F.; SAAD, E. B.; TROGER, A.; FRANCKE, W.; ZARBIN, P. H. G. (1R, 2S, 6R)-Papayanol, feromona de agregação do carrapé de goiaba, *Conotrachelus psidii*. J. Braz. Chem. Soc. 2015 ; 26: 784 - 789 .
- PAMPLONA, A. M. S. R.; OLIVEIRA, E. DA S. Obtenção e manutenção de adultos de *Conotrachelus* sp. (Broca-do-Fruto de cupuaçu) em condições de laboratório. Manaus - AM: Embrapa Amazônia Ocidental, 2013. Documentos (INFOTECA-E).
- PAVARINI, D. P.; LOPES, N. P. Chemical Ecology and Volatile Terpenes Biosynthesis of Arnica-da-Serra' from Brazil. *Revista Virtual de Química*, v. 8, p. 242-261, 2016.
- PIÑERO, J. C.; AND PROKOPY, R. J. Field evaluations of plant odor and pheromonal combinations for attracting plum curculios. *J. Chem. Ecol.* 29:2735–2748, 2003.
- PIÑERO, J. C.; WRIGHT, C. E.; AND R. J. PROKOPY. Response of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) to odor baited traps near woods. *J. Econ. Entomol.* 94: 1386-1397, 2001.
- PINTO-ZEVALLOS, D.; MARTINS, C.; PELLEGRINO, A.; ZARBIN, P. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. *Química Nova*, 39, 1395–1405, 2013.
- PRANCE, G.T.; SILVA, M.F. Árvores de Manaus. Manaus: INPA, 1975. P.249-250.
- RASMANN, S.; KOLLNER, T. G.; DEGENHARDT, J.; HILTPOLD, I.; TOEPFER, S.; KUHLMANN, U.; GERSHENZON, J.; TURLINGS, T. C. J. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect damaged maize roots. *Nature*, 434, 732, 2005.
- SHRIVASTAVA, G.; ROGERS, M.; WSZELAKI, A.; PANTHEE DR, CHEN F. Plant volatiles-based insect pest management in organic farming. *Crit Rev Plant Sci.* 29:123–133, 2010.
- STEIDLE, J. L. M; STEPPUHN, A.; REINHARD, J. Volatile cues from different host complexes used for host location by the generalist parasitoid *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Basic and Applied Ecology*, v. 2, n. 1, p. 45-51, 2001.
- TEWARI, S.; LESKEY, T.; NIELSEN, A.; RODRIGUEZ-SAONA, J.; PIÑEROAND, C. Integrated Pest Management. Elsevier Inc. San Diego. USA. Chap. 9 Use of pheromones in insect pest management, with special attention to weevil pheromones, pages 141–168, 2014.
- TREVISAN, O. Comportamento da broca dos frutos do cacau *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Col: Curculionidae) em Rondônia. Dissertação de Mestrado em Entomologia. ESALQ, Piracicaba, 1989.
- TREVISAN, O.; PEREIRA, F. F.; CUSTODIO, R.A. Constatação de atividade noturna de *Conotrachelus humeropictus* (Coleoptera: Curculionidae), broca dos frutos do cacau e do cupuaçu. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, Natal, RN. 2010.

VENDRAMIM, J. D. O controle biológico e a resistência de plantas. In: PARRA, J. R. P., BOTELHO, P. S. M., CORRÊA-FERREIRA, B. S., BENTO, J. M. S. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 125-142. 2002.

VILELA, E.F.; PALLINI, A. Uso de semioquímico no controle biológico de pragas. In: Parra, J.R. et al., Controle biológico no Brasil: predadores e parasitóides. São Paulo: Manole, 2002.

WHALON, M.; NORTMAN, D.; WISE, J.; GUT, L.; EPSTEIN, D. Plum curculio management and spray timing. Michigan State Univ Fruit CAT Newsletter 21:1-3, 2006.

WRIGHT, G. A.; LUTMERDING, A.; DUDAREVA, N.; SMITH, B. H. Intensity and the ratios of compounds in the scent of snapdragon flowers affect scent discrimination by honeybees (*Apis mellifera*). *J.Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 191: 105-114, 2005.

XIAO, Y.; WANG, Q.; ERB, M.; TURLINGS, T. C. J.; GE, L.; HU, L.; LI, J.; HAN, X.; ZHANG, T.; LU, J. H.; LOU, Y. Specific herbivore-induced volatiles defend plants and determine insect community composition in the field. *Ecology Letters* 15, 1130, 2012.

Capítulo II

Extração e identificação do feromônio de agregação de *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) oriundos de pomares de cupuaçu no Estado do Amazonas.

4. Extração e identificação do feromônio de agregação de *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) oriundos de pomares de cupuaçu no Estado do Amazonas.

RESUMO

A Broca-do-fruto do cupuaçuzeiro, *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) é considerada a mais importante praga desta cultura. Disseminada na maioria dos plantios do estado do Amazonas, limita a expansão desta frutífera, em função da severidade de seus danos e adoção de métodos de controle pouco eficientes. A descoberta de substâncias químicas que intermedeiam as relações entre organismos, feromônios, associada a estudos biológicos desta espécie, pode permitir o desenvolvimento de novos produtos para uso no manejo integrado desta praga. O objetivo foi avaliar se a espécie de *C. humeropictus* produz feromônio sexual ou de agregação e, se este feromônio tem potencial para ser usado no manejo desta praga na cultura de cupuaçuzeiro. Machos e fêmeas de *C. humeropictus* foram coletados em plantações de cupuaçuzeiro localizados nos campos experimentais da Embrapa Amazônia Ocidental, no ano de 2017, e submetidos a técnica de aeração forçada para coleta de voláteis. A análise química dos extratos de aeração de machos e fêmeas mostrou que os machos produzem três compostos específicos que não estão presentes nos extratos de aeração de fêmeas, os compostos ácido grandisoico, grandlure I e grandlure II. Bioensaios em olfatométrica em Y mostraram que os voláteis de machos são atrativos para fêmeas e que fêmeas respondem para o composto majoritário ácido grandisoico. A análise usando cromatografia gasosa com coluna quiral e comparação com dados de tempo de retenção da literatura mostrou que o isômero produzido pelos machos é o (1R,2S)-ácido grandisoico. A produção do ácido grandisoico por macho foi de 2.86 ng/inseto em 24h. Os compostos minoritários foram produzidos em quantidades de traços, não sendo possível sua quantificação. As possibilidades de usar esses compostos no manejo de *C. humeropictus* é discutido.

Palavras chaves: Ácido grandisoico, broca-do-cupuaçu, ecologia química.

Extraction and identification of the aggregation pheromone of *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) from cupuassu orchards in the State of Amazonas.

SUMMARY

The cupuassu fruit borer, *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) is considered the most important pest of this culture. Disseminated in most plantations in the state of Amazonas, it limits the expansion of this fruit, due the amplitude, severity of damages, and the inefficient control methods. Currently the only control method available for *C. humeropictus* is through the use of pesticides, which is not recommended, mainly due to being a crop practiced in the middle or in forest areas of the Amazon. Thus, there is an enormous need to research alternative methods and less aggressive to the environment for the management of this pest. The discovery of chemical substance that interfere in the relations between organisms, called pheromones, associated with biological studies of this species, may allow the development of new products for use in integrated pest management in the cupuaçu. Therefore, the objective of this study was to evaluate if the species of *C. humeropictus* produced sexual pheromone or of aggregation and if this pheromone has potential to be used in the management of this pest in the cultures of cupuassu in Amazonas. To identify the pheromone of *C. humeropictus* males and females were collected in cupuassu plantations located in the experimental fields of Embrapa Western Amazon, in the year 2017, and subjected to forced aeration technique to collect volatiles. The chemical analysis of aeration extracts of males and females showed that males produce three specific compounds that are not present in the aeration extracts of females, the compounds grandisoic acid, grandlure I and grandlure II. Bioassays in Y olfactometry showed that male volatiles are attractive to females and that females also respond to the grandisoic acid major compound. Analysis using chiral column gas chromatography and comparison with retention time data from the literature showed that the isomer produced by males is the (1R, 2S)-grandisoic acid. The production of grandisoic acid per male was 2.86 ng / insect in 24 hours. The minority compounds were produced in trace amounts, not being quantification possible. The possibilities of using these compounds in the management of *C. humeropictus* are discussed.

Keywords: Grandisoic acid, cupuassu, chemical ecology.

4.1. INTRODUÇÃO

O cultivo do cupuaçu é visto como uma das mais importantes atividades agrícolas da região Amazônica do Brasil em função da grande aceitação no mercado interno e externo da polpa *in natura* ou processada (SAID, 2011; VENTURIERI, et al., 1985; MULLER; CARVALHO, 1997).

Atualmente, a cultura do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum, Malvaceae) ocupa a quarta posição em área plantada das lavouras permanentes no Amazonas (5.536 ha). Compõe lista de produtos cuja produção é relevante em âmbito regional, ao lado do açaí (*Euterpe oleracea*), pupunha (*Bactris gasipaes*) e graviola (*Annona muricata*) (ALMUDI; PINHEIRO, 2015).

Entretanto, nas últimas duas décadas, estudos apontam para o aumento gradativo dos níveis de infestações de larvas de *Conotrachelus humeropictus* em cultivos no Amazonas, com valores superiores a 50% de frutos brocados (LOPES; SILVA, 1998). Vários fatores são responsáveis por essa redução, entre eles se destaca a broca-do-fruto (GARCIA et al., 1997).

As larvas de *C. humeropictus* são responsáveis pelos danos diretos, em decorrência da formação de galerias, da destruição da polpa, das sementes e da contaminação interna dos frutos verdes. Os danos indiretos são causados pelos microrganismos e insetos oportunistas que penetram através dos furos no epicarpo construídos pelas larvas (TREVISAN; MENDES, 1991).

Os agricultores que se dedicam ao cultivo do cupuaçuzeiro reconhecem a importância de novas tecnologias que possam auxiliar no controle de pragas como forma de evitar perdas significativas dos plantios. Todavia, normalmente se deparam com a escassez de informações ou métodos de controle eficientes para a broca-do-fruto (SAID, 2011).

Notadamente, os aspectos fitossanitários quando incipientes, podem comprometer o desenvolvimento das culturas. As medidas preventivas, atualmente empregadas ao controle da broca-do-cupuaçu (cultural e químico, p.ex.) ainda reservam espaços para o uso de feromônio e outros semioquímicos no manejo integrado de pragas. Nesse sentido, a pesquisa por novas alternativas para o controle de pragas tem se intensificado e a busca por moléculas com uma atividade inseticida mais seletiva, com menor toxicidade ao ambiente e as espécies não alvo e ao homem têm sido priorizadas (GOULART, 2015). Os registros da literatura dão conta da existência de diversos compostos feromonais em distintas espécies de curculionídeos.

A maioria dos feromônios para esta família é produzido pelos machos. No geral, atraem ambos os sexos, por isso são conhecidos como feromônios de agregação. (HOCK et al., 2014; TEWARI et al., 2014; AMBROGI et al., 2009; SEYBOLD; VANDERWEL, 2003).

Entre as espécies do gênero *Conotrachelus* com o feromônio de agregação isolado, sintetizado e testado, destaca-se *C. nenuphar*. Machos de *C. nenuphar* produzem como feromônio de agregação o composto; ácido grandisoico. Testes de campo revelaram que tanto a mistura racêmica do ácido grandisoico como os enantiômeros puros, atraem machos e fêmeas desta espécie. Armadilhas desenvolvidas para o monitoramento de *C. nenuphar* (gorgulho da ameixa) iscadas com semioquímicos (feromônio e voláteis de planta) têm apresentado boa eficiência na coleta do gorgulho (*C. nenuphar*) em pomares de ameixa, maçã e pera (PROKOPY et al., 2003; TUMLINSON et al., 1969; LESKEY; WRIGHT, 2004).

Os resultados alcançados nesta área de conhecimento ainda são pontuais e restritos a esforços isolados. No Amazonas, a identificação do feromônio e a avaliação da atividade comportamental, para o controle da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro, são etapas que o presente estudo objetiva responder no âmbito do manejo integrado de pragas.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Obtenção da Criação Estoque

Os insetos utilizados nos experimentos em laboratório foram obtidos durante a safra em plantações de cupuaçuzeiro da Estação Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, situada no Km 29 da rodovia AM 010, no município de Manaus no Amazonas, latitude 2°53'S e longitude 59°58'W, nos anos de 2015, 2016 e 2017 (Figura 2.1). Larvas de quarto instar, foram coletadas manualmente após a quebra de frutos infestados, recém caídos e recolhidos aleatoriamente sob a copa das árvores. Após a quebra dos frutos, as larvas foram contadas, separadas por tamanho e cor, mantidas em recipiente de plástico transparente de 400 mL, com tampa perfurada, contendo em seu interior solo umedecido, para obtenção dos adultos.

Os recipientes foram mantidos com temperatura de 26 ± 2 °C e umidade relativa de 75 ± 10 % com fotoperíodo de 12:12 (fotofase/escotofase) até a emergência dos adultos. Após a emergência, os insetos foram sexados e mantidos individualmente em placas de Petri em câmaras climatizadas, com temperatura de 26 ± 2 °C e umidade relativa de 75 ± 10 % com fotoperíodo de 12:12 (fotofase/escotofase) (PAMPLONA; OLIVEIRA, 2013).

Os adultos foram mantidos em dieta natural composta por pedaços frescos de cana-de-açúcar, (aproximadamente 10 cm de comprimento do colmo repartido em quatro partes) trocados a intervalo de dois dias. Especificamente, no ano de 2017, além do método descrito acima, os adultos também foram coletados por meio do sacolejo. No método do sacolejo uma tela de preferência de cor clara é estendida no chão, na projeção da copa da árvore que, em seguida, é sacudida. Em função dos adultos apresentarem comportamento de tanatose quando se sentem ameaçados, eles são coletados no momento em que se jogam ao chão sob a tela fingindo-se de mortos (TREVISAN, 1989).

Após a coleta pelo método do sacolejo, os adultos foram transportados até o Laboratório de Entomologia da Embrapa Amazônia Ocidental, separados por sexo e mantidos em placas de Petri, em grupos de até 10 indivíduos em dieta de cana-de-açúcar.

A separação dos sexos foi feita com base em observação da região esternal do último segmento abdominal (Figura 2.2). Os machos apresentam seis segmentos abdominais contendo uma depressão na área central do último segmento. As fêmeas, apresentam cinco segmentos e, no último, além de uma depressão central, encontram-se duas depressões laterais (SILVA; ALFAIA, 2004; MENDES,1989). Os voucher specimens estão depositados na coleção entomológica permanente da Embrapa Amazônia Ocidental.



Figura 2. 1 Área experimental utilizada para coleta de insetos e voláteis de plantas de cupuaçu. Área experimental utilizada para coleta de insetos e voláteis de plantas de cupuaçu. Estação Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, Km 29 da rodovia AM 010. Pomar Nagibão (2°53'17.39"S; 59°57'59.22"O). A e B, vista aérea do pomar Nagibão e sua dimensão em volta da floresta. C, plantas de cupuaçu e D, sacolejo de plantas de cupuaçu localizadas na borda da floresta.



Figura 2. 2 Vista inferior do abdome de macho e fêmea de *C. humeropictus*. Separação dos sexos com base em observação da região esternal do último segmento abdominal.

4.2.2. Coleta de voláteis de *C. humeropictus*

Os voláteis foram obtidos através da técnica de aeração. Cinquenta machos e/ou 50 fêmeas foram colocadas em câmaras de vidro individuais (com volume interno de 1 L) hermeticamente fechadas. Na tampa da câmara há duas entradas, em uma das entradas conecta-se o filtro de carvão ativado, por onde o ar irá entrar (0.8 litros por minuto), na outra será a saída onde se conectou o adsorvente químico que é ligado a uma bomba de vácuo (0.4 LPM) (Figura 2.3). Para a coleta de voláteis utilizou-se o adsorvente Super Q.

Os voláteis foram coletados a cada 24 horas em tubos de vidro contendo 60 mg do polímero adsorvente Porapak Q (50-80 *mesh*, Bellefonte, PA, EUA). Esses foram eluídos dos tubos adsorventes usando 500 μL do solvente orgânico *n*-hexano e concentrados para 50 μL sob fluxo de N_2 . Após o processo de eluição, os tubos foram limpos usando 2 mL de *n*-hexano e aquecidos à 180°C, sob fluxo constante de nitrogênio, por trinta minutos antes de serem colocados novamente nas câmaras de aeração. As amostras obtidas foram armazenadas a -20°C até sua utilização em cromatógrafo gasoso acoplado ao detector de ionização de chamas (CG-DIC), CG acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) e em bioensaios comportamentais.

Para a coleta de voláteis foram utilizados adultos da criação estoque após a emergência em laboratório e adultos do campo coletados pela técnica do sacolejo. Os insetos coletados pelo método de sacolejo e obtidos do fruto foram mantidos separados com o intuito de avaliar a produção do feromônio dos insetos provenientes das duas metodologias de coleta.

As coletas de voláteis foram realizadas em sala climatizada ($T: 26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) com fotoperíodo 12L:12E. Durante a coleta dos voláteis, os insetos foram alimentados com

pedaços de cana-de-açúcar (aproximadamente 10 cm de comprimento do colmo repartido em quatro partes) como fonte alimentar, sendo substituídos a cada 48 horas.

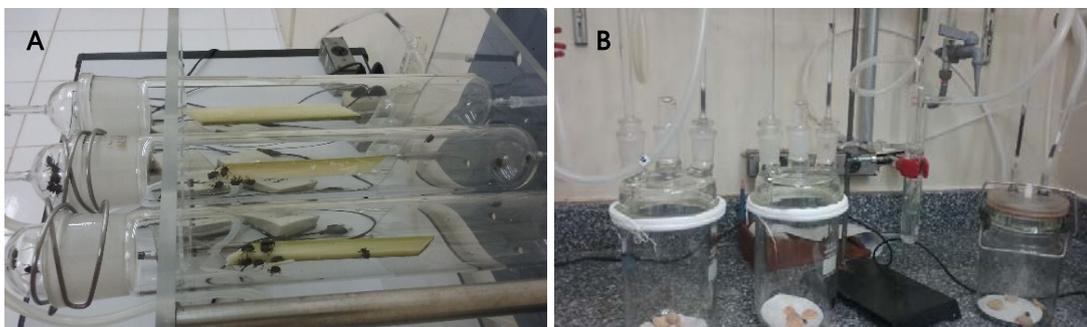


Figura 2. 3 Sistema de aeração para coleta de voláteis de machos e fêmeas de *C. humeripictus* separados, juntamente com cana-de-açúcar como fonte alimentar. A - câmara de aeração utilizadas em Manaus, B - câmara de aeração utilizada em Brasília.

4.2.3. Análises químicas

Para as análises quantitativas dos compostos, a cada amostra foi acrescida de 1 μL do composto 16-hexadecanolactona, como padrão interno (PI), preparado em *n*-hexano destilado, a uma concentração final de 0,01 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Posteriormente, 1 μL de cada extrato de aeração foi injetado no CG (Agilent 7890A, coluna apolar DB-5MS, 0,32 mm de diâmetro x 60 m de comprimento e filme de 0,25 μm , Supelco, Bellefonte, PA, EUA), com detector de ionização de chama (DIC), usando o modo *splitless* e tendo o hélio como gás de arraste. A temperatura inicial da rampa foi de 50°C por 2 min, aumentando gradualmente 5°C.min⁻¹ até atingir 180°C, onde foi mantida por 0,1 min, seguida de um segundo aumento gradual de 10°C.min⁻¹ até atingir 250°C, permanecendo nessa temperatura por 20 min. A temperatura do detector foi de 270°C e do injetor de, 250°C. A quantificação dos compostos liberados pelos insetos foi realizada por meio de comparação das áreas de cada composto em relação à área do PI. Desta forma, considerou-se o fator de resposta do detector, para todos os compostos, igual a 1. Os dados foram analisados com auxílio do software GC ChemStation e tabulados em Excel (Microsoft Office para Mac 2015, Microsoft Corporation, EUA).

Na avaliação qualitativa, amostras selecionadas foram injetadas no CG-EM (Agilent 5975-MSD) equipado com analisador quadrupolar, em coluna apolar DB-5MS (0,25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento, com filme de 0,25 μm , Supelco, Bellefonte, PA, EUA), com ionização de impacto de elétrons (70 eV, temperatura de 200°C) e injetor no modo

splitless. O gás hélio foi usado como gás de arraste. Os dados foram coletados e analisados com no software ChemStation.

A identificação dos compostos orgânicos voláteis foi realizada por comparação do padrão de fragmentação dos componentes da amostra com o de dados catalogados em bibliotecas espectrais (NIST 2008) e também pelo cálculo do índice de retenção (IR). Para calcular o IR, uma mistura de hidrocarbonetos alcanos lineares (C8-C26) foi injetada nas mesmas condições descritas anteriormente. Para a confirmação final, o padrão de fragmentação e o IR dos compostos foram comparados com os dados obtidos da coinjeção de padrões autênticos com as amostras, quando havia o padrão disponível.

4.2.4. Produção do feromônio por *C. humeropictus*

Para determinar a quantidade diária do composto majoritário emitido por machos de *C. humeropictus*, foram coletados extratos de aerações de 65 machos durante 24 horas. Para avaliar se há períodos de maior produção do feromônio ao longo do dia os voláteis dos machos foram coletados em dois períodos: noturno (18:00 às 06:00) e diurno (06:00 às 18:00). A quantificação foi realizada com base no composto majoritário o ácido grandisoico. Os compostos minoritários estão em quantidades de traços, o que não possibilita uma quantificação com exatidão. Cada extrato (50 µL) foi acrescido de 1 µL do composto 16-hexadecanolactona, como padrão interno (PI) em uma concentração de 1mg/ml para comparação de áreas. Posteriormente, 2µL de cada solução foi injetado no CG (Agilent 7890, coluna apolar DB-5, 0,32 mm de diâmetro x 60 m de comprimento, filme 1,0 µm, Supelco, Bellefonte, PA, EUA), com detector de ionização por chama (DIC) a 250°C, usando o modo *splitless* e tendo o Hélio como gás de arraste. A temperatura inicial da rampa foi de 50°C por 2 min, aumentando gradualmente 5°C/min até 180°C por 0,1 min, seguida de um segundo aumento gradual de 10°C/min até 250°C por 20 min. A quantificação dos compostos liberados pelos insetos foi realizada por meio de comparação das áreas de cada composto em relação à área do PI utilizado. Desta forma, considerou-se o fator de resposta do detector para todos os compostos igual a 1. Os dados foram coletados com o *software* ChemStation e analisados com o Excel (Microsoft Office 2007, Microsoft Corporation, EUA). Os dados referentes a dinâmica de emissão do feromônio na fotofase e escotofase foram avaliados estatisticamente usando ANOVA seguida pelo teste Tukey a 5% de significância.

4.2.5. Configuração absoluta do ácido grandisoico produzido por *C. humeropictus*

A configuração absoluta do ácido grandisoico produzido pelos machos de *C. humeropictus* foi conduzida através da análise no CG-EM usando uma coluna quirral (30 mm×0.25 mm i.d., 0.25 µm, β-DEX 325 com 25% 2,3-di-*O*-acetil-6-*O*-TBDMS-β-ciclodextrina em SPB-20 poli (20% fenil/ 80% dimetisiloxana) (Supelco, EUA). A temperatura do forno foi programa como: 60°C por 3 min, aumentando a 1 °C/min até 120 °C e mantida nesta temperatura por 30 minutos. Injeções foram feitas no modo splitless, com hélio como gás de arraste a 0.7 mL/min, injetor a 250°C. A temperatura da interface do CG-EM em 280°C. Ionização por impacto por elétrons. Foi injetado 2 µL de cada amostra, o ácido grandisoico sintético, produzido a partir do grandisol racêmico, e os extratos de macho da broca do cupuaçu obtidos nas aerações.

4.2.6. Bioensaios em olfatômetro

4.2.6.1. Status fisiológicos dos insetos testados

Os bioensaios para avaliar a atratividade de machos e fêmeas em laboratório aos odores de insetos adultos vivos e extratos de aeração de adultos (Figura 2.14) foram realizados nos meses de abril e maio de 2017. Para odor de insetos vivos, adultos do campo, coletados pelo método do sacolejo entre os meses de janeiro e março de 2017 e mantidos em laboratório com dieta exclusiva de cana-de-açúcar, foram usados como fonte de odor (20 indivíduos em cada seringa). Os insetos respondedores foram da coleção estoque nos dois bioensaios, com idade variando entre 30 e 60 dias.

Os bioensaios com ácido grandisoico impregnado no septo (Figura 2.15, Figura 2.16) foram realizados entre os meses de abril e maio de 2017. Adultos do campo, coletados pelo método do sacolejo entre os meses de janeiro e março de 2017 e mantidos em laboratório com dieta exclusiva de cana-de-açúcar, foram utilizados como insetos respondedores.

Os bioensaios com soluções sintéticas de ácido grandisoico, grandisolactona e grandisol (Figura 2.15) foram realizados entre os meses de agosto e setembro de 2017 e os insetos respondedores foram da coleção estoque, com dieta exclusiva de cana-de-açúcar, e idade variando entre 90 e 120 dias.

Para avaliar a atratividade de machos e fêmeas em laboratório para odores de insetos adultos vivos, extratos de aeração de adultos e os compostos macho-específico sintético, foi utilizado um olfatômetro em “Y” manufaturada em acrílico (26 x 23 cm), com uma cavidade em forma de “Y” (corpo 12 cm e braços 10,5 cm), mantida entre duas placas de vidros de mesmas dimensões, um translúcido na parte inferior e o outro transparente na parte superior, prensados por cliques de papel (MORAES et al., 2005). Seringas de vidro (10 mL) onde foram colocados os odores a serem testados, foram conectadas a cada braço do olfatômetro através de mangueiras de silicone (Figura 2.4). Neste sistema, um fluxo contínuo de ar umidificado e filtrado em carvão ativo atravessa os dois braços do tubo até a extremidade oposta (Sentido **B** e **C** para **A**). No lado oposto, um único adulto, macho ou fêmea, da broca-do-cupuaçuzeiro foi introduzido na área de liberação do olfatômetro, no extremo oposto à corrente de ar, e seu padrão de procura foi registrado durante dez minutos. Foram considerados como não responsivos os insetos que não se movimentavam nos primeiros 5 min de observação. Foram avaliados a primeira escolha (considerada quando o inseto entrou e permaneceu em um dos braços por pelo menos 20 s). Os testes foram realizados durante o período de maior liberação do feromônio (18:00 às 00:00), usando o olfatômetro em posição horizontal. Cada adulto foi usado apenas uma vez e os filtros de papel contendo 10µL de extratos e/ou solução sintética foram trocados a cada cinco repetições, quando a posição dos braços era invertida entre tratamento. Foram realizadas 30 repetições com resposta, para machos e para fêmeas. Em todos os bioensaios com solução sintética foi utilizado uma concentração de 0.01mg/mL.

A resposta comportamental de machos e fêmeas foi avaliada com os seguintes tratamentos: 1) odor de machos vivos versus ar, 2) odor de fêmeas vivas versus ar, 3) voláteis de extrato de aeração de machos versus ar, 4) voláteis de extrato de aeração de fêmeas versus ar, 5) septo impregnado com 2 mg de ácido grandisoico versus ar, 6) solução sintética de ácido grandisoico versus grandisolactona, 7) solução sintética de grandisolactona versus ar, 8) solução sintética de ácido grandisoico + grandisolactona versus ar, 9) solução sintética de ácido grandisoico + grandisol versus ar e 10) solução sintética de ácido grandisoico + grandisol versus solução sintética de ácido grandisoico.

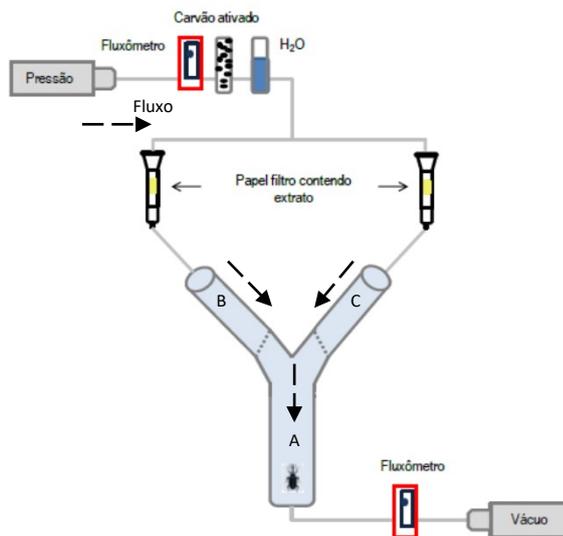


Figura 2. 4 Diagrama do sistema de bioensaios em olfatômetro em “Y”. O ar no sistema foi regulado por um fluxômetro (0,6 L/min), filtrado por carvão ativado e umidificado. O fluxo foi dividido para as seringas contendo o papel filtro impregnado com os extratos e/ou solução sintética. No extremo oposto, uma bomba de vácuo conectada a um fluxômetro (0,2 L/min) permitia a formação de um gradiente de odor dentro do sistema. Fonte: Magalhães, 2012.

Em virtude da demora no tempo de resposta dos insetos, observada nos bioensaios conduzidos em olfatômetro em “Y” manufaturada em acrílico (Figura 4), um segundo grupo de bioensaios foram realizados, utilizando-se um olfatômetro de vidro com adaptador anti-splash de capacidade para 250 ml (Figura 5). Por esta constatação, os bioensaios foram realizados durante 12 horas (18:00 – 06:00) por grupo de insetos colocados no olfatômetro. A resposta comportamental de 10 machos ou 10 fêmeas foi avaliada com o seguinte tratamento:

- 1) septo impregnado com 2 mg de ácido grandisoico versus ar. Adultos do campo foram utilizados como respondedores. Inicialmente, esses bioensaios foram realizados no laboratório de Semioquímicos – CENARGEN/Brasília e em seguida na Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus, tendo em vista garantir as condições ambientais em que a espécie está inserida.

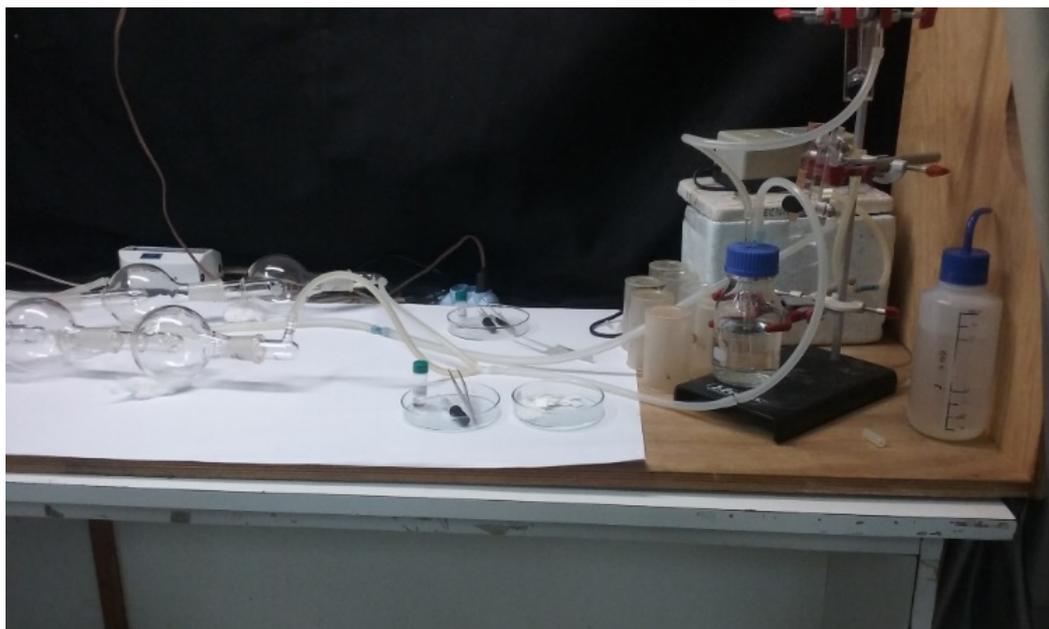


Figura 2. 5 Olfatômetro em “Y” adaptado, vidraria anti-splash.

4.2.7. Eletroantenografia (EAG) para *C. humeropictus*

Para a análises eletrofisiológicas, as antenas de fêmeas do campo de *C. humeropictus* foram cortadas e posicionadas entre dois eletrodos de aço inoxidável, e gel condutor foi aplicado para fechar o circuito da ponte salina. Uma solução sintética contendo o composto majoritário do macho o composto ácido grandisoico a 0.01mg/mL foi analisada usando um CG (Perkin Elmer) equipado com coluna apolar HP-5 (0,25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento, com filme de 0,25 μm , Supelco, Bellefonte, PA, EUA), detector DIC e injetor no modo *splitless*, acoplado a um eletroanténógrafo (Synthec-CG-EAD). A temperatura inicial da rampa foi de 50°C por 1 min, aumentando gradualmente 15°C.min⁻¹ até atingir 250°C, onde foi mantida por 10°C.min⁻¹. A temperatura do detector foi de 270°C e do injetor, 250°C. O gás de arraste utilizado foi o Hélio. No CG-EAD o fluxo da coluna é dividido, onde metade do efluente vai para o detector DIC e a outra metade para a antena do inseto. As respostas das antenas foram medidas em despolarizações (mV), de modo que os sinais passavam por um amplificador de alta impedância (UN-06, Synthec, Holanda) e as gravações simultâneas das respostas do EAD e do DIC foram analisadas utilizando um *software* específico (EAD versão 2.14, Synthec, Holanda). Foram realizadas três repetições com as antenas de fêmeas.

4.2.8. Teste de campo

Para avaliar a atratividade de *C. humeropictus* para o composto majoritário ácido grandisoico e um dos compostos minoritários o grandlure I (grandisol). Não foi realizado com o grandlure II por que esse composto não estava disponível no laboratório. Os testes de campo foram realizados no período de dezembro de 2016 a janeiro de 2017 e de maio a junho de 2017, na estação experimental da Embrapa Amazônia Ocidental.

Para os testes de atração das iscas, 35 árvores de cupuaçu com idade de 20 anos e com altura aproximada de 4 metros foram selecionadas próximo da floresta (20) e no interior do pomar (10). No primeiro período, todas as plantas apresentavam frutos de diferentes tamanhos e flores em menor número. Além disso, era constatado por meio do sacolejo a presença de insetos adultos no pomar e frutos brocados com larvas. No segundo período, as plantas não apresentavam flores e frutos e o número de insetos adultos obtidos por meio do sacolejo era reduzido em relação ao período anterior.

As armadilhas utilizadas foram do tipo pirâmide, de cor preta, adaptadas contendo um septo de cada tratamento (Figura 2.6) (TEDDERS, WOOD. 1994; LESKEY; WRIGHT 2004; PROKOPY et al., 2003). Foram afixadas a 0,5 metros do tronco de cada árvore, com distancia aproximada de 30 m (Figura 2.7) (PROKOPY et al., 2000). O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições. Após 24 horas foram realizadas vistorias para constatação de captura por um período de 30 dias.

Tratamento 1. Ácido grandisoico 2 mg/septo; Tratamento 2. Ácido grandisoico 4 mg/septo; Tratamento 3. Ácido grandisoico 2 mg + grandisol 2mg/septo; Tratamento 4. Ácido grandisoico 4 mg + grandisol 2mg/septo; Tratamento 5. Ácido grandisoico 2 mg + Grandlure completo 2mg/septo; Tratamento 6. Ácido grandisoico 4 mg + grandlure completo 2mg/septo; Tratamento 7. Testemunha



Figura 2. 6 Armadilhas utilizadas para captura dos insetos. A - armadilha tipo pirâmide, utilizada no campo, adaptadas contendo um septo impregnado, B - Localização da armadilha em relação a planta de cupuaçuzeiro.



Figura 2. 7 Área experimental da Embrapa Amazônia Ocidental. Esquema de distribuição das armadilhas.

4.2.9. Análises estatísticas

Respostas dos machos e fêmeas nos bioensaios foram analisadas pelo teste Qui-Quadrado. Para hipótese nula foi considerada de 95% de confiança. Todos os dados foram analisados com o programa R 2.14.0 (R Development Core Team, 2009) com nível de significância de $p < 0.05$. Não houve captura de insetos nas armadilhas colocadas no campo, assim sendo não foi possível analisar os dados estatisticamente.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Identificação dos compostos macho-específicos de *Conotrachelus humeropictus*

As análises dos extratos de aeração dos insetos, machos e fêmeas virgens, obtidos dos frutos e criados em laboratório, durante os anos de 2015, 2016 e 2017 não revelaram a liberação de feromônio. Esse fato, pode ser explicado a luz da chamada lógica do pensamento ecológico nutricional de insetos, ou seja, o inseto atinge seu potencial fisiológico máximo no desempenho de suas atividades biológicas, com conseqüente contribuição reprodutiva para a próxima geração ao nível máximo quando dispõem de condições ideais de fatores abióticos e bióticos, alimento em abundância e de elevada qualidade nutricional (PANIZZI; PARRA, 2009; HOCK et al., 2014; TREVISAN et al., 2010).

Os insetos mantidos no laboratório tiveram dieta constituída exclusivamente de cana-de-açúcar, o que pode, segundo essa teoria, ter comprometido a emissão dos compostos feromonais. As informações sobre a influência da quantidade e qualidade do alimento ingerido, nas fases jovem e/ou adulta, sobre emissão e percepção de feromônios em insetos, de modo geral, ainda são escassas (HARDEE, 1970). Porém, Scriber e Slansky (1981) asseguram que os seres vivos em geral são um reflexo do que consomem e, no caso dos insetos, muitos aspectos de sua biologia, incluindo o comportamento, a fisiologia e a ecologia estão, de uma ou outra maneira inserida num contexto nutricional. Para Lima e Della Lucia (2001), a síntese do feromônio pode ser contínua, porém a liberação e percepção no ambiente são controladas pelo estado fisiológico dos insetos e por condições climáticas e ambientais.

Somente em extratos de aeração *C. humeropictus* oriundos do campo, coletados pela técnica do sacolejo, na safra (janeiro a março) de 2017, foi possível identificar a liberação de feromônio, por meio da comparação dos perfis cromatográficos dos extratos de aeração de machos e fêmeas. É provável que os componentes nutricionais assimilados por estes insetos em ambiente natural, possam ter contribuído para esta liberação feromonal, além de outros fatores já mencionados.

Essas comparações demonstraram a presença de três compostos específicos do macho, o majoritário ácido grandisoico 2,1-metil-2-(prop-1-en-2-il)ciclobutil) ácido acético, e dois minoritários grandlure I (Z)-2-Isopropenil-1-metilciclobutanoetanol e grandlure II (Z)-2-(3,3-Dimetilciclohexilideno)-etanol. Os compostos tiveram sua estrutura química definida e foram confirmados através da comparação do espectro de massas e do tempo de retenção com as

injeções de padrões sintéticos (Figura 2.8 e 2.9). Esses resultados coadunam com estudos sobre feromônios já identificados para *Conotrachelus nenuphar* (ELLER, BARTELT, 1996) e *C. humeropictus* em populações do estado de Rondônia. (SZCZERBOWSKI, 2016).

O composto ácido grandisoico, já foi descrito como feromônio para o gorgulho da ameixa, *C. nenuphar* (ELLER; BARTELT, 1996). Foi sugerido ácido grandisoico como nome popular, por ser análogo ao grandisol. Neste trabalho, os autores observaram em armadilhas no campo a atração de machos e fêmeas de *C. nenuphar* ao ácido grandisoico, considerando-o um feromônio de agregação.

Os estudos sobre a ecologia química de *C. humeropictus* com insetos oriundo de populações de Rondônia, apontaram a presença de quatro compostos produzidos por machos. Três destes compostos foram identificados, grandisol, ácido grandisoico (majoritário) e uma lactona (minoritário) derivada do ácido grandisoico, sendo a primeira descrição desta como um composto natural (SZCZERBOWSKI, 2016). No entanto, a lactona provavelmente não faz parte da mistura feromonal de *C. humeropictus*. Esta é um artefato formado na decomposição do ácido grandisoico no injetor de CG em alta temperatura.

Quando os extratos de aeração foram injetados no injetor splitless observou-se a formação de um quarto pico, que não estava presente nos cromatogramas de fêmeas, que foi identificado como gradisolactona* (grandisolide em inglês). No entanto, observou-se que a mesma amostra quando injetada no CG-DIC ou no CG-EM produzia quantidades diferentes desse composto. Provavelmente, o mesmo estava sendo formado dentro do injetor splitless a uma temperatura de 250°C. Para avaliar se a temperatura do injetor no liner poderia acelerar a degradação do ácido grandisoico, as amostras foram injetadas em um CG-DIC com um injetor cool-on-column, com temperatura inicial de 40°C.

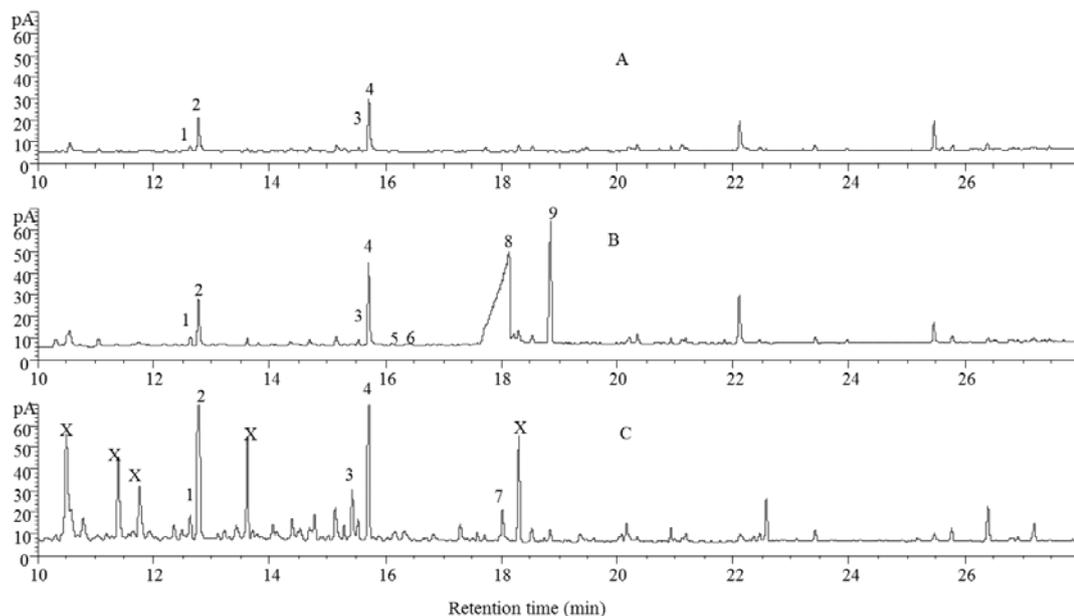


Figura 2. 8 Perfil cromatográficos do extrato de aeração obtidos na análise de CG-DIC com injetor splitless. A. fêmeas de *C. humeropictus* + cana de açúcar, B. machos de *C. humeropictus* + cana de açúcar. C) cana-de-açúcar, 1) undecano, 2) nonanal, 3) dodecano, 4) decanal, 5) grandlure I, 6) grandlure II, 7) tridecano, 8) ácido grandisoico, 9) grandisolactona proveniente da degradação do ácido grandisoico no injetor splitless.

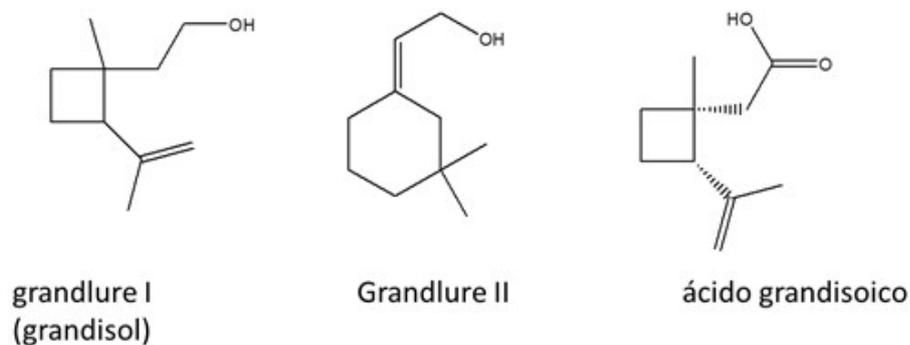


Figura 2. 9 Estrutura química dos três compostos identificados no extrato de aeração de machos de *C. humeropictus*.

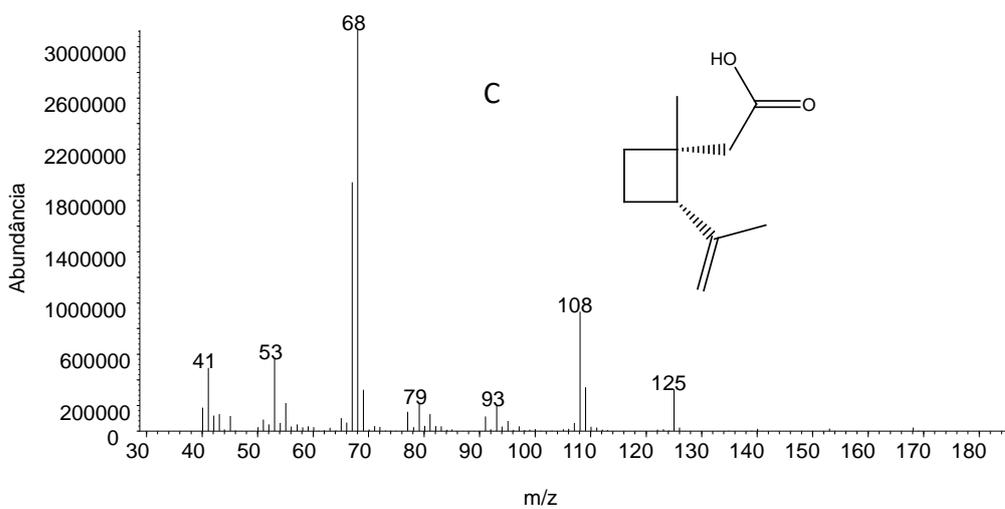
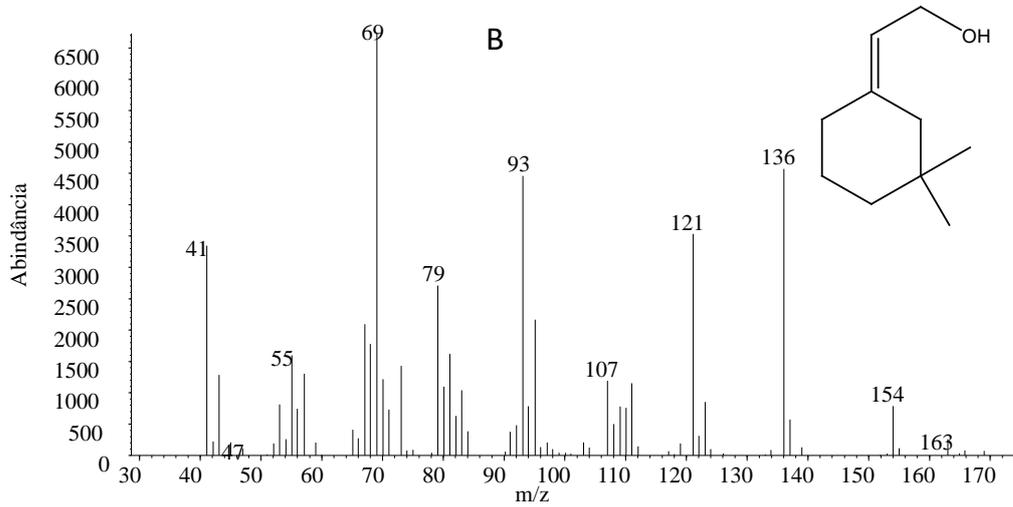
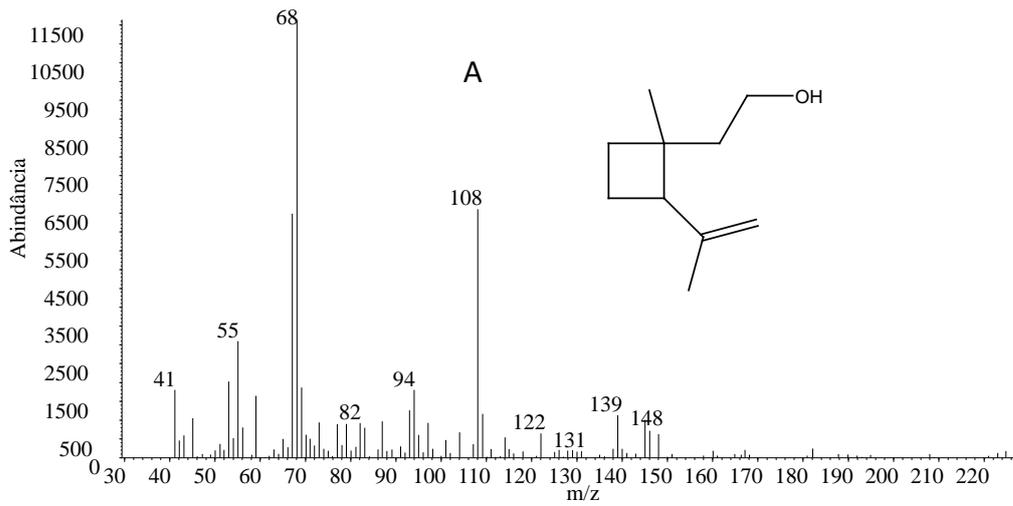


Figura 2. 10 Espectro de massas dos três compostos específicos dos machos. A. grandlure I, B grandlure II e C ácido grandisoico.

Quando os extratos foram injetados no injetor cool-on-column o pico 9 não foi observado (Figura 11). No injetor cool-on-column a amostra é injetada diretamente na coluna, que não tem o liner de vidro, e além disso a temperatura do injetor está programada para 40°C., diferente do injetor splitless que tem o liner de sílica e as injeções são realizadas em alta temperatura para auxiliar na volatilização a 250°C. O liner com o uso pode tornar-se ligeiramente ácido e, com a temperatura alta do injetor pode provocar reações dentro do liner. Era isso que estava ocorrendo. O ácido grandisoico estava decompondo e formando o grandisolactona (Figura 2.8).

Uma das formas de produzir grandisolactona sintética é através da reação de ácido grandisoico em meio ácido (HBr 68% aquoso a temperatura ambiente) Szczerbowski et al. (2016). Apesar do liner ter uma acidez bem menor que o HBr, o liner dentro do injetor está a 250°C, o que aumenta a reatividade do composto. Com esta observação todas as amostras passaram a ser injetadas somente no injetor cool-on-column.

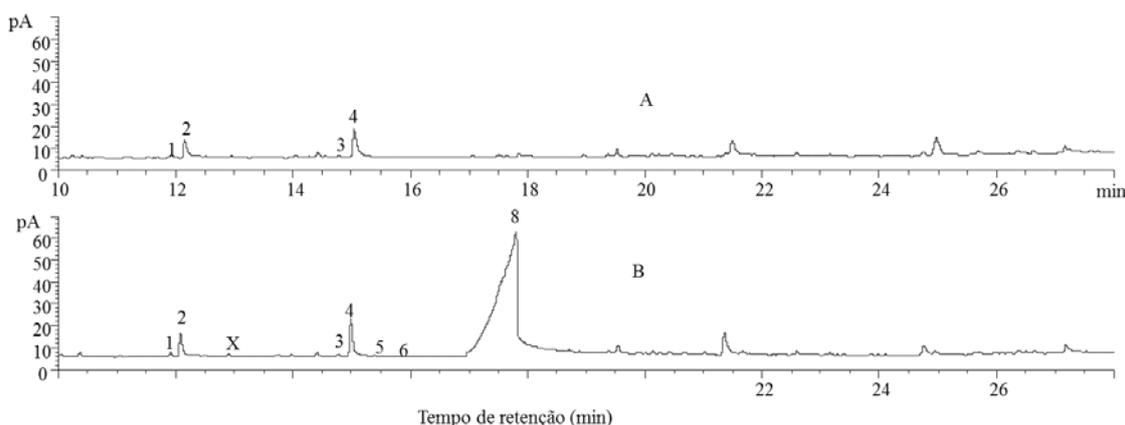


Figura 2. 11 Perfil de cromatograficos do extrato de aeração de *C. humeripictus* obtidos usando uma entrada de coluna fresca a 40oC. A. fêmeas + cana-de-açúcar, B. machos + cana-de-açúcar. 1) undecano, 2) nonanal, 3) dodecano, 4) decanal, 5) grandlure I, 6) grandlure II, 8) ácido grandisoico

4.3.2. Elucidação da configuração absoluta do ácido grandisoico

A elucidação da configuração absoluta do ácido grandisoico foi realizada indiretamente através da configuração da grandisolactona formada no injetor splitless do CG. O ácido grandisoico racêmico não separou na coluna quiral que foi utilizada β -DEX 325, mas percebeu-se que ao injetar a mistura racêmica do ácido grandisoico com o injetor splitless este se degrada em dois isômeros de grandisolactona mostrando que o ácido grandisoico sintético

injetado era composto de dois isômeros (1*S*,2*R*) e (1*R*,2*S*) (Figura 2.12A). Usando o mesmo tipo de coluna e condições de corrida de Sczerbowski et al. (2016) a análise mostrou que o isômero (1*S*,6*S*)-grandisolactona elui primeiro que o seu enantiômero (1*R*,6*R*).

Assim, ao injetar o extrato de aeração de machos de *C. humeropictus* observou-se que somente um pico correspondente a grandisolactona foi formado (Figura 2.12B), e pelo tempo de retenção e em comparação ao que foi descrito por Sczerbowski et al. (2016) foi determinado que a grandisolactona formada pela degradação do ácido grandisoico é (1*R*,6*R*) e portanto o ácido grandisoico produzido pelos machos da população de Manaus tem a configuração absoluta (1*R*,2*S*) (Figura 2.12C). Não foi possível identificar a configuração absoluta do grandlure I e II devido a presença destes compostos a nível de traços.

A configuração absoluta do composto ácido grandisoico liberado por *C. humeropictus* (1*R*,2*S*), também foi descrita para a espécie *C. nenuphar* (ELLER, BARTELT, 1996). Nesta, o feromônio produzido por machos é o enantiômero (+) do ácido grandisoico e atrai ambos os sexos e cepas (ELLER; BARTELT, 1996). No entanto, Hock et al. (2017) destacam outros estudos em que a mistura racêmica produzida sinteticamente de ácido grandisoico contendo quantidades iguais dos enantiômeros (+) como (-), também foi atraente (PIÑERO et al., 2001), fracamente atraente (PIÑERO; PROKOPY, 2003; LESKEY; WRIGHT, 2004) e pouco atraentes (LESKEY; PROKOPY, 2000; AKOTSEN-MENSAH, 2010).

O fato de o inseto produzir dois compostos derivados, com a mesma configuração absoluta, evidencia a tendência do inseto a percorrer o caminho de menor gasto energético durante a síntese natural de moléculas necessárias para sua comunicação (SEYBOLD; WANDERWEL, 2003).

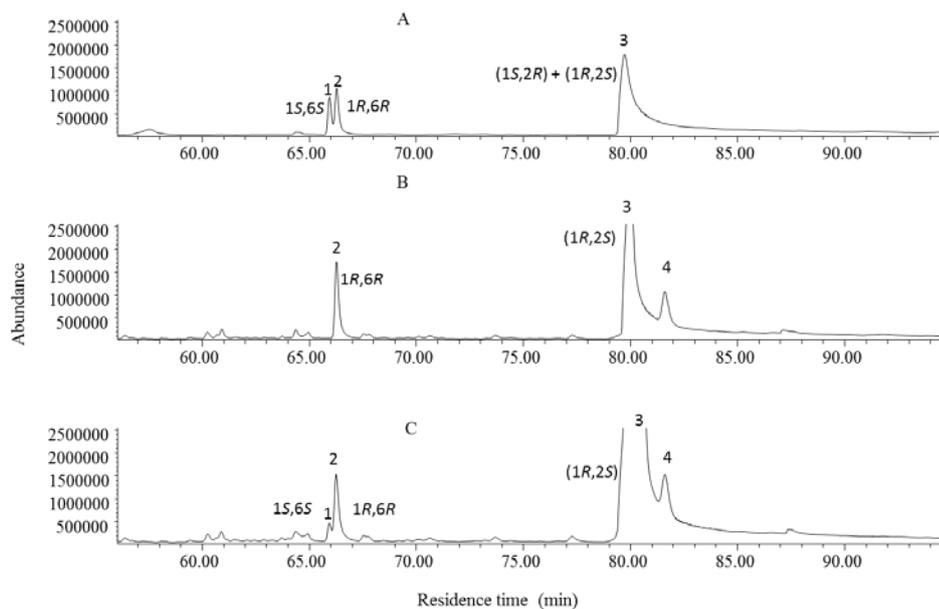


Figura 2. 12 Análise em CG-quiral do A) ácido grandisoico, B) extrato de aeração de 55 machos de *C. humeropictus*, C) co-injeção do ácido grandisoico com o extrato de aeração de 55 machos. 1) (1S,6S)-grandisolide, 2)(1R,6R)-grandisolide, 3) ácido grandisoico, 4) geranyl acetona.

4.3.3. Quantificação do composto ácido grandisoico

A análise quantitativa mostrou que um inseto libera uma média de 2.86 ± 1.01 ng/inseto de ácido grandisoico por dia. As análises da periodicidade de emissão dos compostos demonstraram que a liberação de feromônio de *C. humeropictus* ocorre de forma mais intensa durante a escotofase (1.41 ± 0.35 ng/inseto) (Figura 2.13).

Observações em laboratório, campo e em estudos de biologia de *C. humeropictus* apontam que o período noturno é o de maior atividade biológica do inseto (LOPES, 2000, TREVISAN et al., 2010; OLIVEIRA, 1998). Segundo Lopes (2000), durante a noite os besouros locomovem-se mais, demonstrando ser uma atividade preferencial desenvolvida no horário noturno, marcada principalmente por caminhamento e ocasionalmente por voos curtos. Esse comportamento já foi relatado para *C. psidii* Marshall 1922 e *Conotrachelus nenuphar* Herbst, 1797 (Coleoptera; Curculionidae) (RACETTE et al., 1992) e pode está relacionado com capturas de maior intensidade durante a noite em estudo de atratividade de *C. nenuphar* em armadilhas (LAMOTHE, 2008). Uma vez que a liberação de feromônio da espécie *C. humeropictus* ocorre principalmente durante o período noturno, confirma-se assim a hipótese inicial.

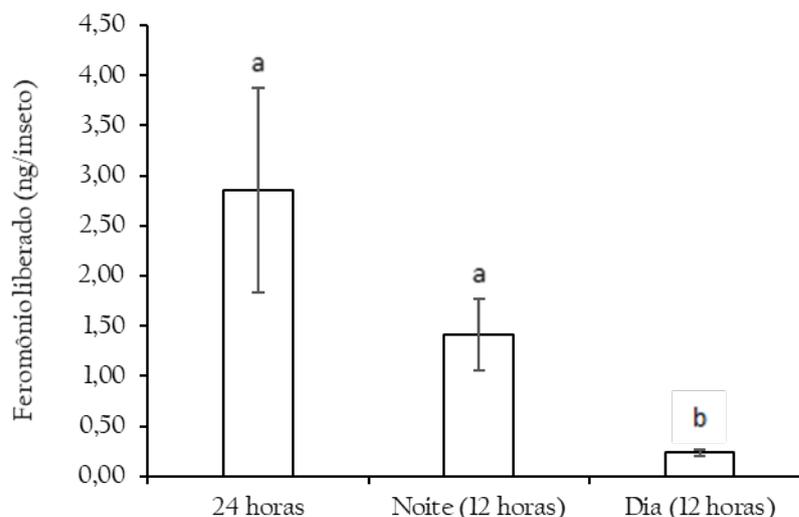


Figura 2. 13 Emissão média do composto ácido grandisoico por machos de *C. humeripictus*, durante a escotofase e fotofase ($F_{2,12} = 4,425$, $p = 0,03088$). Colunas seguidas de letras distintas diferem significativamente (teste Tukey; $P < 0,05$) ($n = 6$).

4.3.4. Avaliação da atividade biológica de *C. humeripictus* mediante os compostos sintetizados

Os compostos identificados foram testados nos bioensaios com adultos de *C. humeripictus* em laboratório. Foram utilizados odores de insetos vivos, voláteis dos extratos de aerações de machos e fêmeas e os compostos na forma sintética.

4.3.5. Bioensaios com olfatômetros em Y

O status fisiológico dos insetos utilizados em cada bioensaio está descrito na metodologia. Os insetos que não escolheram nenhum dos lados do olfatômetro, não foram considerados na análise estatística. Os extratos de aeração de adultos machos utilizados nos bioensaios continham o composto ácido grandisoico, antes identificados em cromatografia gasosa.

Os compostos minoritários foram encontrados em apenas algumas amostras na forma de traços. É provável que a ausência desses compostos nos extratos tenha sido determinante

para não resposta dos insetos, tendo em vista, que o grandisol é reconhecidamente um componente feromonal de muitas espécies de curculionídeos (AMBROGI et al., 2009).

Não foi observada atratividade significativa nas respostas de machos e fêmeas para os tratamentos com odor de insetos vivos e extratos de aeração de insetos adultos; odor de insetos vivos (machos) x ar, para machos ($\chi^2 = 2.080, p = 0.144$); odor de insetos vivos (machos) x ar, para fêmeas ($\chi^2 = 0.133, p = 0.715$); odor de insetos vivos (fêmeas) x ar, para machos ($\chi^2 = 2.080, p = 0.144$); odor de insetos vivos (fêmeas) x ar, para fêmeas ($\chi^2 = 0.133, p = 0.715$); extratos de aeração de insetos (machos) x ar, para machos ($\chi^2 = 0.133, p = 0.715$); extratos de aeração de insetos (machos) x ar, para fêmeas ($\chi^2 = 3.33, p = 0.067$); extratos de aeração de insetos (fêmeas) x ar, para machos ($\chi^2 = 0.533, p = 0.465$); extratos de aeração de insetos (fêmeas) x ar, para fêmeas ($\chi^2 = 0.133, p = 0.715$) (Figura 14).

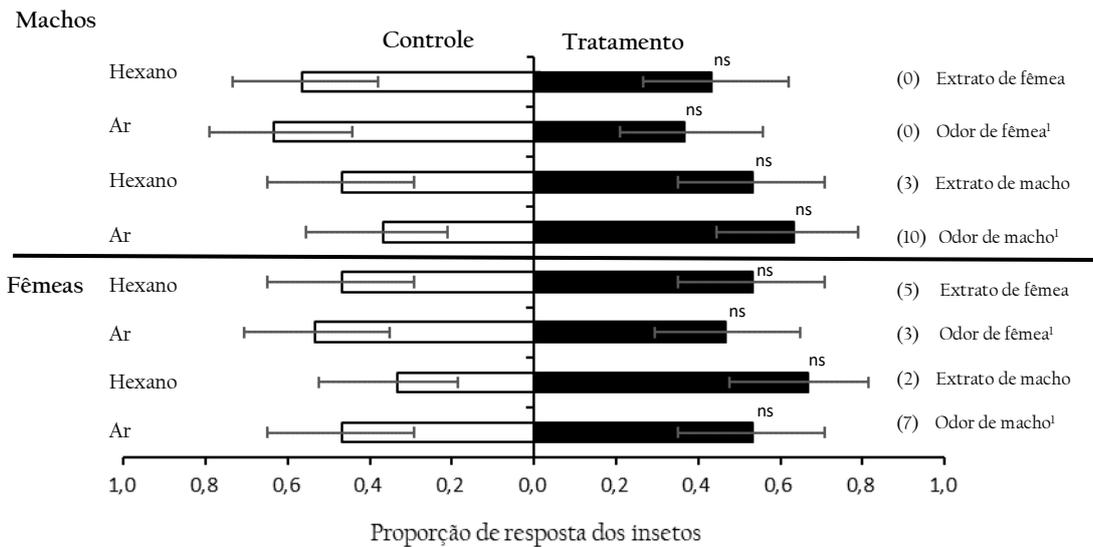


Figura 2. 14 Primeira escolha de machos e fêmeas de *Conotrachelus humeropictus* procedentes da coleção estoque e campo1 para odor e extratos de insetos vivos em bioensaios com olfatômetro em Y. A primeira escolha foi analisada por Regressão logística; X2 e teste de Wald para avaliar a significância. Barras representam o IC a 95%. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), onde: *, $0,05 > p > 0,01$. ns: não significativo. Números entre parênteses representam os bioensaios com insetos que não responderam aos estímulos odoríferos.

Em princípio, deve-se ressaltar, que a produção, liberação e percepção dos feromônios nos insetos dependem de fatores endógenos como idade, presença de co-específicos, condição reprodutiva, aspectos nutricionais e de uma ampla variedade de condições ambientais como

planta hospedeira, temperatura, fotoperíodo, intensidade luminosa, umidade relativa e condições atmosféricas (LIMA; DELLA-LUCIA 2001; PANIZZI; PARRA, 2009).

Segundo Hock et al. (2014), machos de *C. nenuphar* podem produzir feromônio de oito a 36 dias de idade, com um pico médio entre 12 e 20 dias. Isso indica, possivelmente, que os machos da coleção estoque utilizados nos bioensaios, provavelmente não estariam sintetizando, emitindo ou mesmo percebendo feromônio no momento dos testes, tendo em vista a idade superior a 30 dias.

Estudos sobre respostas em olfatômetro de *C. nenuphar* para odores de insetos vivos, extratos de planta e feromônio, desenvolvidos por Hock et al. (2017) revelaram que machos virgens e maduros provocavam maior atração de fêmeas, além de produzirem mais feromônio durante a escotofase na presença de fruta hospedeira. É provável que os machos alimentados por vários dias, exclusivamente com cana-de-açúcar, tenham cessado a emissão do feromônio, ou os insetos respondedores, com idade entre 30 e 60 dias não tivessem status fisiológicos para responder aos estímulos olfativos. Esses autores recomendam que, em estudos olfatométricos usando ácido grandisoico sintético ou machos vivos, devem incluir o uso de respondedores alimentados.

De acordo com Altafini et al. (2010), em lepidópteros, a idade de machos, pode ser uma característica endógena relevante na comunicação intraespecífica. Segundo os autores, é constatado que, no campo, machos de lepidópteros exibem níveis crescentes de percepção ao feromônio durante os primeiros dias após a emergência, havendo um decréscimo de respostas, em insetos mais velhos.

Contudo, os resultados obtidos até o momento ainda são insuficientes para se explicar sobre os possíveis efeitos da idade e alimentação de *C. humeropictus* na síntese e emissão de feromônio.

Nos bioensaios com soluções sintéticas (Figura 2.15) foram usados machos e fêmeas da coleção estoque com idade entre 90 – 120 dias. A concentração de cada solução foi de 0,01 mg.ml e a quantidade impregnada em cada papel foi de 10 µL.

Não foram observadas respostas significativas de machos e fêmeas para as seguintes soluções sintéticas; *grandisolactona* x ar, para machos ($\chi^2 = 0.133$, $p = 0.715$); *grandisolactona* x ar, para fêmeas ($\chi^2 = 0.533$, $p = 0.4652$); ácido grandisoico x

grandisolactona, para machos ($\chi^2 = 2.133$, $p = 0.144$); ácido grandisoico x grandisolactona, para fêmeas ($\chi^2 = 0.133$, $p = 0.715$); ácido grandisoico + grandisolactona x ar, para machos ($\chi^2 = 0.533$, $p = 0.465$); ácido grandisoico + grandisolactona x ar, para fêmeas ($\chi^2 = 2.133$, $p = 0.144$); ácido grandisoico + grandisol x ar, para machos ($\chi^2 = 2.133$, $p = 0.144$); ácido grandisoico + grandisol x ar, para fêmeas ($\chi^2 = 2.133$, $p = 0.144$); ácido grandisoico + grandisol x ácido grandisoico, para machos ($\chi^2 = 0$, $p = 1$) e ácido grandisoico + grandisol x ácido grandisoico, para fêmeas ($\chi^2 = 0.133$, $p = 0.715$).

É provável que a concentração das soluções utilizadas além da idade dos insetos tenham sido determinantes na manifestação da pouca resposta dos insetos nesse estudo e, devem ser melhor elucidados. Alguns trabalhos asseguram que a concentração e a proporção de odores individuais colocados em uma combinação demonstraram ser um fator muito importante *C. nenuphar* (LESKEY et al., 2001; LESKEY; PROKOPY, 2001). Além disso, Gilblin-Davis et al. (1996) destacam que em algumas ocasiões a resposta aos feromônios é mais acentuada quando estes são associados com cairomônios vegetais. Segundo Viana (1992), em *Cosmopolites sordidus*, os adultos são atraídos com maior eficácia por voláteis liberados por machos, fêmeas e rizomas da bananeira.

Outra questão a ser considerada nos bioensaios com soluções sintéticas é que a grandisolactona, constatada nesse estudo, é um produto da degradação do ácido grandisoico dentro do liner, o que provavelmente, não constitui o feromônio dessa espécie, logo não foi percebida pelos insetos nos bioensaios.

Os bioensaios com o ácido grandisoico impregnado em septos (Figura 2.15 e 2.16) foram conduzidos tanto em Brasília quanto em Manaus (local com as condições ambientais em que a espécie está inserida), com machos e fêmeas recém coletados do campo. Para tanto, foram utilizados dois tipos de olfatômetros em Y, a placa manufatura acrílica e o adaptado com vidraria anti-splash. A adoção do olfatômetro adaptado para os bioensaios ocorreu após constatação que os insetos demoravam a responder e provavelmente precisassem de um período maior de exposição frente ao composto majoritário. Desta forma, os bioensaios foram realizados durante 12 horas (18:00 – 06:00) por grupo de insetos colocados no olfatômetro.

Diferente da solução impregnada em papel, que volatiliza rapidamente, os septos liberam o composto por um período maior e conseqüentemente podem ser percebidos por inseto que demoram a responder.

Indiferente ao tipo de olfatômetro, nos bioensaios com o ácido grandisoico impregnado em septos, fêmeas do campo preferiram o braço do olfatômetro contendo odor do ácido grandisoico ($\chi^2 = 4.8, p = 0.028$) (Figura 15 e 16).

Adultos de *C. humeropictus* mantidos em laboratório e alimentados somente em cana-de-açúcar, por estarem em condições artificiais, tendem a não acasalar. Desta forma, o mais adequado é realizar os testes diretamente no campo com a mistura sintética do feromônio, até o estabelecimento de uma colônia adequada envolvendo a segunda e a terceira geração obtida em ambiente de laboratório.

Bartelt (1999) mostrou que o ácido grandisoico constitui o feromônio de agregação com atratividade para machos e fêmeas de *C. nenuphar*. Neste sentido, era esperado que para *C. humeropictus* houvesse também atração de machos e fêmeas. Todavia, observou-se somente em fêmeas. Há de se considerar, para os bioensaios, a importância da natureza multicomponente dos feromônios na percepção pelos insetos, compostos individuais ou mesmo a eliminação de qualquer componentes pode interferir no comportamento de resposta.

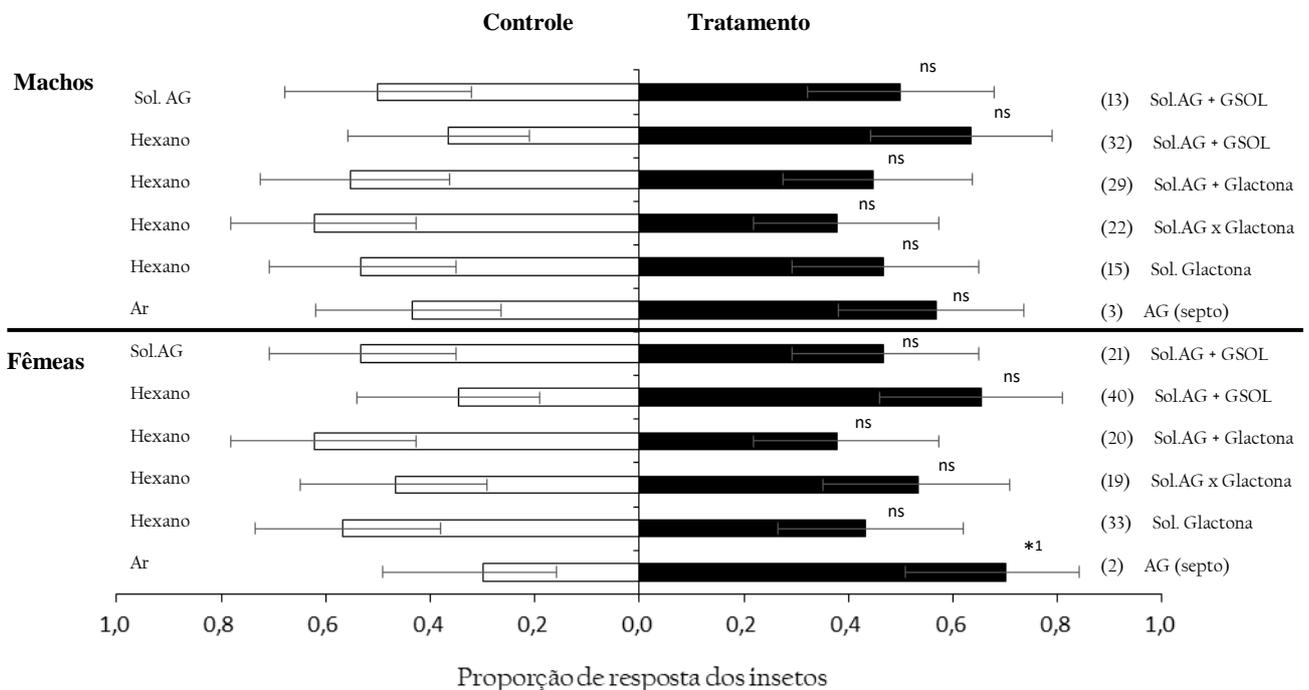


Figura 2. 15 Primeira escolha de machos e fêmeas de *Conotrachelus humeropictus* procedentes da coleção estoque e campo1 para solução sintética (ácido grandisoico (Sol.AG), Grandisolactona (Sol. Glactona) e Grandisol (Sol.GSOL) - 0,01 mg.ml), ácido grandisoico septo (AG-septo - 2 mg/septo) em bioensaios com olfatômetro em Y manufatura acrílico. A primeira escolha foi analisada por Regressão Logística; X^2 e teste de Wald para avaliar a significância. Barras representam o IC a 95%. Asterisco

indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), onde: *, $0,05 > p > 0,01$. ns: não significativo. Números entre parentes representam os bioensaios com insetos que não responderam aos estímulos odoríferos.

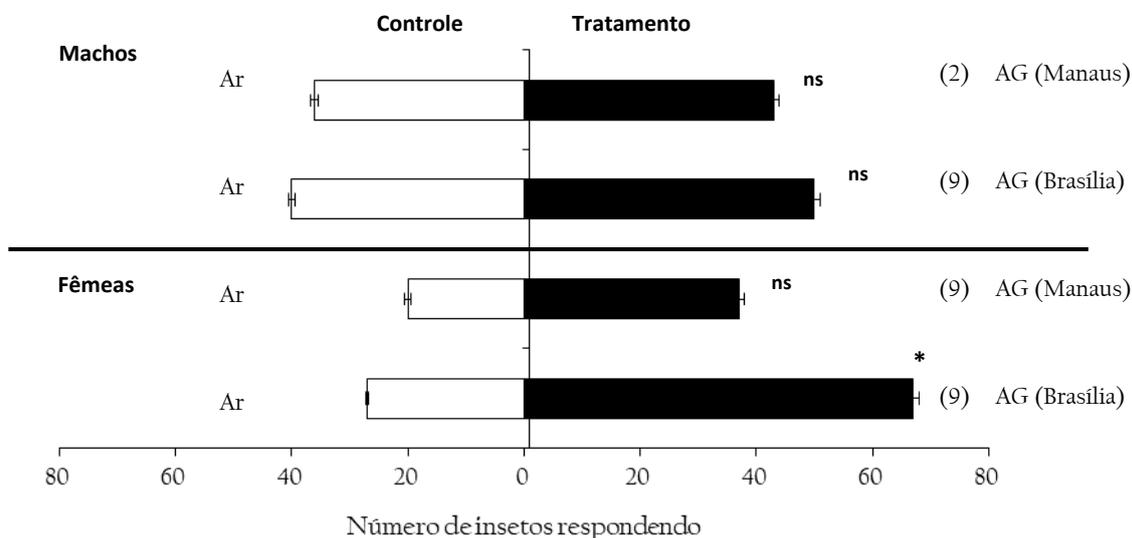


Figura 2. 16 Primeira escolha de machos e fêmeas de *Conotrachelus humeropictus* procedentes do campo para ácido grandisoico (AG) - 2 mg/septo em bioensaios com olfatômetro em Y adaptado com de vidraria anti-splash. X2 para avaliar a significância. Barras representam o IC a 95%. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), onde: *, $0,05 > p > 0,01$. ns: não significativo. Números entre parentes representam os bioensaios com insetos que não responderam aos estímulos odoríferos.

4.3.6. Eletroantenografia (EAG) de *C. humeropictus*

Na análise por GC-EAD, antena de fêmea de *C. humeropictus* respondeu a solução sintética de ácido grandisoico a 0.01 mg/mL (Figura 2.17). Mostrando que fêmeas apresentam proteínas receptoras de ligantes de odores para este composto, indicando que este composto tem potencial para ter uma função comportamental de atratividade. Esse estudo não foi conduzido com os machos devido a falta de insetos.

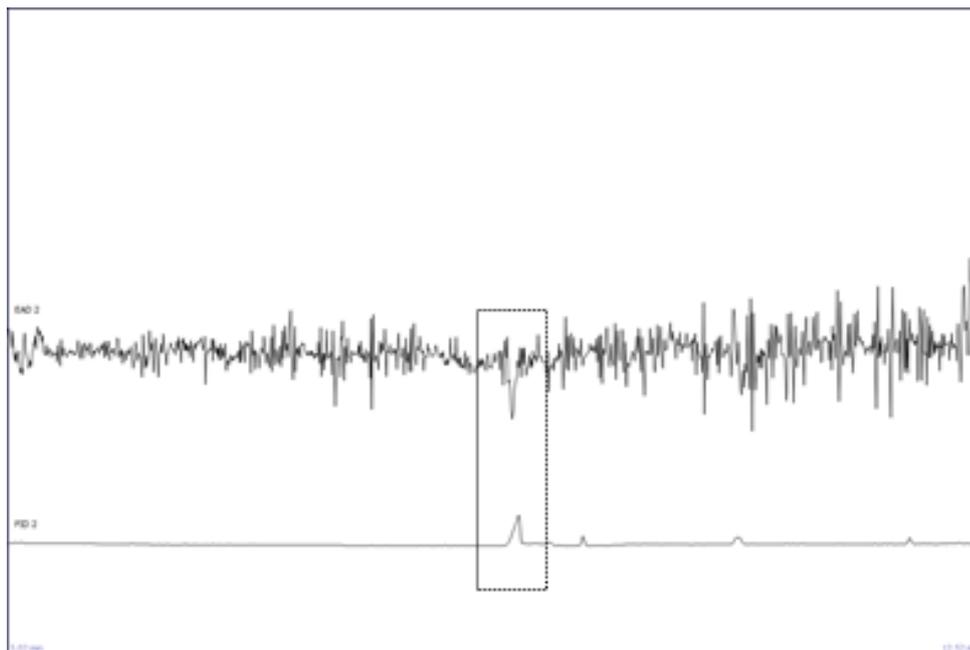


Figura 2. 17 Resposta de uma antena de fêmeas de *C. humeropictus* à solução sintética de 0.01 mg/mL de ácido grandisoico. Análise por CG-EAD.

4.3.7. Teste de atratividade em campo

Os testes conduzidos no campo usando lures (iscas atrativas) impregnados com diferentes proporções e quantidades do ácido grandisoico sozinho ou combinado com o grandisol (grandlure 1) ou com grandlure comercial do bicudo do algodoeiro não atraiu nenhum inseto. A efetividade de iscas atrativas no campo decorre de inúmero fatores, dentre eles, destacam-se a natureza multicomponente do feromônio, a taxa de liberação dos septos, concentração, proporção dos compostos, isolados e/ou mistura racêmica. Além disso, os fatores climáticos, tipos de armadilhas, época, local de instalação ou mesmo a contribuição dos voláteis de plantas, influenciam no processo de atratividade. Todos esses fatores devem ser melhor compreendidos e ajustados ao campo.

Os experimentos de campo foram planejados em 2016, quando não tínhamos feito a identificação do grandlure II, que ocorreu somente em maio de 2017 com insetos provenientes do sacolejo. Assim, sendo a proporção dos componentes nos liberadores não é a mesma que o inseto libera e essa deve ser a principal causa da não captura dos insetos nas armadilhas feromonais. Esses compostos são comuns a vários curculionídeos, e a proporção dos

componentes deve ser um fator importante para reconhecimento da espécie. Novos estudos de campo deverão ser conduzidos usando o ácido grandisoico como composto majoritário e o grandlure I e II com minoritários, mimetizando a liberação natural dos insetos.

O composto macho-específicos, ácido grandisoico, teve como resultado em laboratório a atração de fêmeas. Portanto, era esperado que ao menos as fêmeas fossem atraídas pela isca. No entanto, no campo, nenhum inseto foi capturado para nenhum dos tratamentos. Em campo, muitos fatores podem afetar a atratividade como, por exemplo, a armadilha (modelo, cor e altura da instalação) a concentração dos compostos na isca ou a taxa de liberação (PROKOPY et al., 2000; BAVARESCO 2005).

Adicionalmente, as armadilhas foram instaladas num período de plena frutificação. Nesta fase, os insetos já deveriam ter migrado da floresta para o interior do pomar, provavelmente atraídos pelos voláteis das plantas. Nestas circunstâncias, inexistente a possibilidade de que iscas contendo apenas componentes macho específico, não sejam suficiente para atrair os insetos, tendo em vista inúmeros relatos da literatura que afirmam aumento na captura de insetos em armadilhas no campo quando combinados feromônio e voláteis de planta hospedeira (LESKEY et al., 2001; HOCK et al., 2017; BLAND, 2017; MESQUITA, 2003).

No segundo experimento, realizado de maio a julho, as armadilhas foram instaladas num período em que não tinham flores e nem frutos nas plantas. Nesta época, sem a presença de flores e frutos, provavelmente sem os insetos no campo, as armadilhas com iscas feromonais poderiam agir na atração dos insetos. Porém, isso não ocorreu. Assim, iscas com feromônio dos machos combinado com voláteis da planta hospedeira poderiam ser avaliados nos próximos experimentos de campo.

Estudos diversos citam exemplos de sistema bem estabelecido de monitoramento, com o emprego de armadilhas com feromônio (BENTO et al., 2016; NAVARRO, et al., 2002; VILELA; DELLA LUCIA, 2001; AMBROGI, et al., 2009). O monitoramento de *C. nenuphar* utilizando iscas com atrativo, tem se apresentado eficiente na coleta em cultivos de ameixa, maçã e pera (LESKEY; WRIGHT, 2004; PROKOPY et al., 2003), podendo ser potencializado quando feromônio de *C. nenuphar*, ácido grandisoico, é testado em combinações com limoneno e etil isovalerato ou benzaldeído, que são compostos presentes no

fruto hospedeiro, demonstrando aumentar a captura para alguns tratamentos (PROKOPY et al., 2003).

Não restam dúvidas quanto a necessidade de continuidade de estudos da ecologia química da broca-do-cupuaçu, tanto a nível de laboratório quanto de campo. Estudos como este podem gerar ferramentas de inestimável benefício para o meio ambiente e para o produtor no manejo integrado desta praga.

4.2. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que feromônios produzidos pelos machos de *C. humeropictus* coletados de população do Amazonas, na região de Manaus é constituído do composto majoritário ácido grandisoico e, dos compostos minoritários grandilure I e grandilure II. A liberação desse feromônio ocorre em maior quantidade durante o período noturno, o que faz sentido, uma vez que estes insetos tem hábito noturno, movimentando e acasalando durante à noite.

Os bioensaios com fêmeas em laboratório mostraram atratividade significativa ao ácido grandisoico quando impregnado em septo de borracha. Em função desse resultado, abre-se uma grande perspectiva quanto ao uso desses compostos no campo como alternativa à serem empregados no manejo integrado de *C. humeropictus*.

Os resultados obtidos são de grande importância, porque deram “início” ao estudo da ecologia química da broca-do-fruto do cupuaçu. Com a descoberta do feromônio dessa espécie novos estudos devem ser realizadas tanto a nível de laboratório quanto de campo. Para o sucesso dessa estratégia no efetivo controle da espécie dentro de um contexto de MIP, é necessário que esse trabalho tenha continuidade.

REFERÊNCIAS

- AKOTSEN-MENSAH, C.; BOOZER, R.; FADAMIRO, H.Y. Field evaluation of traps and lures for monitoring plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in Alabama Peaches. *J Econ Entomol* 103(3):744–753, 2010.
- ALMUDI, T.; PINHEIRO, J. O. C. Dados estatísticos da produção agropecuária e florestal do Estado do Amazonas: ano 2013. Brasília, DF: Embrapa, 2015. 103p.
- ALTAFINI, D. L.; SANT'ANA, J.; REDAELLI, L. R. Effect of endogenous factors on the chemical perception of *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) to sex pheromone. *Neotropical entomology*, v. 39, n. 3, p. 330-337, 2010.
- AMBROGI, B. G.; VIDAL D. M; ZARBIN, P. H. G.; ROSADO-NETO, G. H. Feromônios de agregação em Curculionidae (Insecta: Coleoptera) e sua implicação taxonômica. *Química Nova* (Impresso), v. 32, p. 2151-2158, 2009.
- BARTELT, R. J. Weevils. In: HARDIE, J. & MINKS, A. K. (eds.) *Pheromones of Non-Lepidopteran Insects Associated with Agricultural Plants*. CABI Publishing: Wallingford, cap. 5, 1999.
- BAVARESCO, A.; GARCIA, M.S.; BOTTON, M.; NONDILLO, A. Efeito da altura de posicionamento e da cor de armadilhas de feromônio na captura de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick, 1909) (Lepidoptera: Tortricidae) na cultura do caqui. *Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo*, v. 72, n. 3, p. 373-377, jul./set., 2005.
- BENTO J. M. S.; PARRA, J. R. P.; MIRANDA, S. H. G. de; ADAMI, A.C.O. How much is a pheromone worth? 2016. F1000 Res 5:1763
- BLANDE, J. D. Chapter Eleven-Plant Communication With Herbivores. *Advances in Botanical Research*, v. 82, p. 281-304, 2017.
- ELLER, F. J.; BARTELT, R. J. Ácido grandisoico, um feromônio de agregação produzido pelo homem para a *ciruela* Curculio, *Conotrachelus nenuphar*. *J. Nat. Prod.* 59: 451 – 453, 1996.
- FRÍAS, R.A. O estudo dos semioquímicos responsáveis da interação entre a guayaba (*Psidium guajava* L) e o picudo da guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall. 2015. Tesis de Doctorado em Ciências Químicas. Universidad Nacional de Colômbia, Bogotá, Colômbia, 2015.
- GARCIA, M.V.B; PAMPLONA, A.M.S.R.; MORAES, L.A.C. Pragas do cupuaçuzeiro: I - A broca-do-fruto. Manaus: EMBRAPA, Amazônia Ocidental, 1997.
- GILBLIN-DAVIS, R.M., OEHLISCHLAGER, A.C., PEREZ, A., GRIES, G., GRIES, R., WEISSLING, T.J., CHINCHILLA, C.M., PEÑA, J.E., HALLETT, R.H., PIERCE, H.D., GONZALEZ, L.M. Chemical and Behavioral Ecology of Palm Weevils (Curculionidae: Rhynchophorinae). *Fla. Entomol.* 79(2):153-167, 1996.

GOULART, Henrique F. et al., Feromônios: Uma Alternativa Verde para o Manejo Integrado de Pragas. Revista Virtual de Química, v. 7, n. 4, p. 1205-1224, 2015.

HARDEE, D. D.; CROSS, W. H. & MITCHELL, E. B. Male boll weevils are more attractive than cotton plants to other boll weevils. Journal Economic Entomology, 62:165 – 169, 1970.

HOCK, V.; CHOUINARD, G.; LUCAS, E.; CORMIER, D. LESKEY, T.; WRIGHT, S.; ZHANG, A.; PICHETTE, A. Establishing abiotic and biotic factors necessary for reliable male pheromone production and attraction to pheromone by female plum curculios *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). Canadian Entomologist, 146: 528-547, 2014.

HOCK, V., CHOUINARD, G., LUCAS, E., CORMIER, D., LESKEY, T.C., ZHANG, A. Olfactometer responses of plum curculio *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) to host plant volatiles, synthetic grandisoic acid, and live conspecifics. Journal of Insect Behavior, p. 1-20, 2017.

LAMOTHE, S.; CHOUINARD, G.; VINCENT, C. Abiotic factors and trap design modulate the performance of traps used to monitor the plum curculio. Journal of Economic Entomology, v.101, n. 6, p. 1838–1846, 2008.

LESKEY, T.C.; PROKOPY, R.J. Adult plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) attraction to fruit and conspecific odours. Ann Entomol Soc Am 94:275–288, 2001.

LESKEY, T.C.; PROKOPY, R.J.; WRIGHT, S.E.; PHELAN, P.L.; HAYNES, L.W. Evaluation of individual components of plum odour as potential attractants for adult plum curculios. J Chem Ecol 27(1):1–17, 2001.

LESKEY, T. C.; WRIGHT, S. E. Monitoring plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae), populations in apple and peach orchards in the mid-Atlantic. J. Econ. Entomol. 97: 79 – 88, 2004.

LESKEY, T. C.; WRIGHT, S. E.; HOCK, V.; CHOUINARD, G.; CORMIER, D.; LEAHY, K.; COOLEY, D.; TUTTLE, A.; EATON, A.; ZHANG, A. Avaliando respostas eletrofisiológicas e comportamentais a voláteis para melhorar o manejo de armadilhas de armadilha de odor *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae). Environ Entomol 43 (3): 753-761, 2014.

LIMA, E. R.; DELLA LUCIA, T. M. C. 2001. Biodinâmica dos feromônios, PP. 13-29. In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (eds) Feromônios de Insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas (2ªed.). Holos Editora, Ribeirão Preto-SP.

LOPES, C. M. D. SILVA, N. M. Impacto econômico da broca do Cupuaçu, *Conotrachelus humeripictus* Field (Coleoptera: Curculionidae) nos Estados do Amazonas e Rondônia. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v. 27, n.3, p. 481-483, 1998.

LOPES, C. M.D.´A. Biologia, comportamento e flutuação populacional da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro *Conotrachelus* sp. próximo *humeripictus* (COLEOPTERA:

CURCULIONIDAE). 2000. 90p. Tese. (Doutorado em Entomologia) - INPA-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /UFAM-Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

MENDES, A.C. de B.; GARCIA, J.J.S. Controle químico de *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940. (Coleoptera: Curculionidae) em casqueiro de cacau (*Theobroma cacao* L.) In: Congresso Brasileiro de Entomologia, Belo Horizonte, p. 331, 1989.

MESQUITA, A. L. M. Importância e métodos de controle do “moleque” ou broca-do-rizomada-bananeira. Circular Técnica 17 Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, Brasil, 2003.

MORAES, M. C. B.; SOUSA, L. M. P. DE; LAUMANN, R. A.; Borges, M. Metodologia para estudos de semioquímicos e sua aplicação no manejo de pragas. A influência de voláteis de soja no comportamento do parasitóide *Telenomus podisi*. Brasília - DF: Embrapa recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005 (Circular Técnica No. 24).

MULLER, C. H.; CARVALHO, J.E.U. Sistemas de propagação e técnicas de cultivo do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). In: Seminário Internacional sobre pimenta-do-reino e cupuaçu, 1., 1996, Belém-PA. Anais... Belém: Embrapa Amazônia Oriental/JICA, 1997. 440p. (Documentos, 89).

NAVARRO, D. M. A. F.; MURTA, M. M.; DUARTE, A. G.; LIMA, I. S.; NASCIMENTO, R. R.; SANT’ANA, A. E. G. Aspectos práticos relacionados ao uso do rincoforol, o feromônio de agregação da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) no controle de pragas do coqueiro. Análise de sua eficiência em campo. *Química Nova*. 25, 32, 2002.

OLIVEIRA, S. P. de. Biologia reprodutiva de *Conotrachelus humeropictus* (Coleoptera: Curculionidae) broca do cupuaçuzeiro em diferentes substratos. Monografia - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1998.

PAMPLONA, A. M. S. R.; OLIVEIRA, E. DA S. Obtenção e manutenção de adultos de *Conotrachelus* sp. (Broca-do-Fruto de cupuaçu) em condições de laboratório. Manaus - AM: Embrapa Amazônia Ocidental, 2013. Documentos (INFOTECA-E).

PANIZZI, A. R.; J. R. PARRA. Bioecologia e Nutrição de Insetos: Base para o Manejo Integrado de Pragas. Embrapa Informação Tecnológica, 169 p. 2009.

PROKOPY, R.; COOLEY, S.; PHELAN, P. Bioassay approaches to assessing behavioural responses of Plum curculio adults (Coleoptera: Curculionidae) to host odour. *Journal of Chemical Ecology*, 21, 1073–1084, 1995.

PROKOPY, R. J., PHILLIPS, T. W., VARGAS, R.I., JANG, E.B. Defining sources of Coffee Plant Odor Attractive to *Ceratitidis captata* flies. *J. Chem. Ecol.* 23:577- 1587, 1997.

PROKOPY, R. J.; CHANDLER, B. W.; DYNOK, S. A.; AND PIÑERO, J. C. Odor-baited trap trees: a new approach to monitoring plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 96:826–834, 2003.

PROKOPY, R. J.; CHANDLER, B.W.; LESKEY, T. C.; WRIGHT, S.E. Comparison of traps for monitoring plum curculio adults (Coleoptera: Curculionidae) in apple orchards. J. Entomol. Sci. 35: 411-420, 2000.

PIÑERO, J. C.; WRIGHT, S.E.; PROKOPY, R. J. Response of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) to odor baited traps near woods. J. Econ. Entomol. 94: 1386 -1397, 2001.

PIÑERO, J. C., AND PROKOPY, R. J. Field evaluations of plant odor and pheromonal combinations for attracting plum curculios. J. Chem. Ecol. 29:2735–2748, 2003.

RACETTE, G.; CHOUNARD, G.; VINCENT, C.; HILL, S.B. Ecology and management of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae), in apple orchards. Phytoprotection, v. 73, n. 3, p. 85-100, 1992.

SAID, M. M. Aspectos culturais e potencial de uso do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng. Schum.) no estado do Amazonas. 2011. 136p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente) - UFAM, Manaus.

SCRIBER, J. M.; SLANSKY, Jr. F. The nutritional ecology of immature insects. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v.26, p.183-211, 1981.

SEYBOLD, S. J.; VANDERWEL, D. Biosynthesis and endocrine regulation of pheromone production in the Coleoptera. In: BLOMQUIST, G.J. & VOGT, R.G. (eds.) Insect pheromone biochemistry and molecular biology. Elsevier Academic Press, cap. 6, p. 137-200, 2003.

SILVA, N. M.; ALFAIA, S.S. Manejo integrado da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro (Coleoptera: Curculionidae) em sistemas agroflorestais. Projeto RECA Nova Califórnia. Cascalho Editora INPA – Rondônia, 2004.

SILVA FILHO, G. Semioquímicos envolvidos na interação gorgulho-da-goiaba (*Conotrachelus psidii* Marshall) - goiabeira (*Psidium guajava* L.). 2005. 83p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Darcy Ribeiro, 2005.

SZCZERBOWSKI, D.; TORRENS, G. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; OLZENO, T.; SANDRA, M. S.; GOMES, A. T.; KENJI MORI, W. F.; ZARBIN, P. H. G. (1R,6R)-2,2,6-Trimethyl-3-oxabicyclo[4.2.0]octan-4-one, a new monoterpene lactone produced by males of the cocoa borer *Conotrachelus humeropictus* (Col.: Curculionidae) Tetrahedron Lett, v. 57, p. 2842-2844, 2016.

TEDDERS, W. L.; B. W. WOOD. A new technique for monitoring pecan weevil emergence (Coleoptera: Curculionidae). J. Entomol. Sci. 29: 18-30, 1994.

TEWARI, S.; LESKEY, T.C.; NIELSEN, A. L.; PIÑERO, J. C.; RODRIGUEZ-SAONA, C.R. Use of pheromones in insect pest management, with special attention to weevil pheromones. In: Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspectives. D.P. Abrol (Ed.). Elsevier Inc. p.141-168, 2014.

THE PHEROBASE. Data base of insect pheromones and semiochemicals. Disponível em: <<http://www.pherobase.com/>>. Acesso em: 20 set. 2017.

TREVISAN, O.; PEREIRA, F.F.; CUSTODIO, R.A. Constatação de atividade noturna de *Conotrachelus humeropictus* (Coleoptera: Curculionidae), broca dos frutos do cacau e do cupuaçu. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, Natal, RN. 2010.

TREVISAN, O.; MENDES, A.C.B. 1991. Ocorrência de *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae), em frutos de cupuaçu, *Theobroma grandiflorum* Schum. (Sterculiaceae). In: 13º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA. Recife. Resumos. p.137.

TREVISAN, O. Comportamento da broca dos frutos do cacau *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Col: Curculionidae) em Rondônia. Dissertação de Mestrado em Entomologia. ESALQ, Piracicaba, 1989.

TUMLINSON, J. H.; et al., Sex pheromones produced by male boll weevil: Isolation, identification, and synthesis. Science. v. 166, n. 3908, p. 1010-1012, 1969.

VENTURIERI, G. A; ALVES, M. L. B.; NOGUEIRA, M. Q. O Cultivo do cupuaçuzeiro. Informativo SBF, Campinas, v.4, n.1, p.15-17, 1985.

VIANA, A. M. M.; VILELA, E. F. Comportamento de corte e acasalamento de *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). An. Soc. Entomol. Brasil, 25(2):347-350, 1996.
VILELA E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (eds.) Feromônio de insetos: biologia, química e aplicação. Ribeirão Preto: Holos, bcap. 19, p. 151-159, 2001.

Capítulo III

**Avaliação do nível e intensidade de infestação natural de *Conotrachelus humeropictus*
Fiedler (Coleoptera: Curculionidae) em pomar de cupuaçuzeiro.**

5. Avaliação do nível e intensidade de infestação natural de *Conotrachelus humeropictus* Fiedler (Coleoptera: Curculionidae) em pomar de cupuaçuzeiro.

RESUMO

Na cultura do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) a broca-do-fruto (*Conotrachelus humeropictus*) é do ponto de vista fitossanitário a principal praga. Embora existam informações sobre nível de infestação desta broca em pomares de cupuaçu, ainda são necessários estudos que impliquem em informações mais precisas e atualizadas sobre o potencial de danos desta praga a esta cultura. A análise do nível e intensidade de infestação da broca-dos-frutos permite inferências sobre os danos na produtividade e servem de subsídios aos produtores para adoção de medidas de controle. A pesquisa foi desenvolvida em um pomar de cupuaçuzeiro com incidência de broca-do-fruto, da Estação Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, situada no Km 29 da rodovia AM 010, no município de Manaus no Amazonas (2°53' S e 59°58' W), no período de janeiro a dezembro de 2017. As amostras foram representadas por frutos coletados de trinta plantas com idade aproximada de vinte anos, selecionadas no início da safra. A coleta dos frutos foi realizada três vezes ao mês. Os frutos foram caracterizados como sadios (sem presença de larvas ou furos) e brocados (com larvas ou furos por fruto), calculando-se o nível de infestação (NI) da broca nas plantas avaliadas. Neste mesmo período e nas mesmas plantas, foi realizado o levantamento e monitoramento físico de adultos da broca pela técnica do sacolejo. O maior nível de infestação foi observado em plantas localizadas ao redor da mata, onde aproximadamente 91% dos insetos adultos também estavam presentes. O nível de infestação durante a safra chegou a 42%, com média de quatro brocas por fruto. Os adultos de *C. humeropictus* foram coletados em todos os meses do ano, com níveis mais baixos que durante o período da safra. Esses dados ratificam estudos anteriores e ressaltam a importância de técnicas efetivas de controle para esta praga na região Amazônica.

Palavras chaves: dinâmica populacional, broca-do-cupuaçu, insecta.

Evaluation of the level and intensity of natural infestation of *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) in a cupuassu orchard.

SUMMARY

In the cupuassu culture (*Theobroma grandiflorum*) the cupuassu fruit borer (*Conotrachelus humeropictus*) is from the phytosanitary point of view the main pest. Though there is information on the level of infestation of this borer in cupuassu orchards, studies are still needed that imply more accurate and updated information about the potential damage of this pest to this crop. The analysis of the level the intensity and infestation of the fruit-borer allows inferences about the damages in the productivity and as subsidies to the producers for the adoption of measures of control. The research was carried out in a cupuassu orchard with fruit borer incidence, at the Experimental Station of Embrapa Western Amazon, located at Km 29 of the highway AM 010, Manaus, Amazonas (2°53 'S and 59°58' W), in the period from January to December 2017. The samples were represented by fruits collected from thirty plants with an approximate age of twenty years, selected at the beginning of the crop. The fruits were collected three times for month. The fruits were characterized as healthy (without larvae or holes) and brocade (with larvae or holes per fruit), calculating the level of infestation (NI) of the borer in the evaluated plants. During this same period and in the same plants, the surveying and monitoring of adults of the borer was realized by shaking the tree branches. The highest level of infestation was observed in plants located around the forest, where approximately 91% of adult insects were also present. The level of infestation during the crop 42%, with an average of four larvae per fruit. Adults of *C. humeropictus* were collected in all months of the year, with lower levels than during the crop period. These data confirm previous studies and emphasize the importance of the effective control techniques for this pest in the region.

Key words: population dynamics, cupuassu fruit borer, insecta.

5.1. INTRODUÇÃO

A cultura do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum, Malvaceae) é reconhecida como uma das mais importantes atividades agrícolas da região Amazônica do Brasil. (SAID, 2011; VENTURIERI, et al., 1985; MULLER; CARVALHO, 1997). Atualmente, ocupa a quarta posição em área plantada das lavouras permanentes no estado do Amazonas e, nas culturas de lavoura permanente está entre as dez com melhor preço médio ao produtor. Além disso, compõe lista de produtos cuja produção é relevante em âmbito regional, ao lado do açaí (*Euterpe oleracea*), pupunha (*Bactris gasipaes*) e graviola (*Annona muricata*) (ALMUDI; PINHEIRO, 2015).

Apesar da inegável importância, preço, cadeia de valor consolidada, relevância regional e avanços em outros aspectos da cultura, os problemas fitossanitários e, especificamente a broca-do-fruto, ainda representam um fator limitante à expansão do cupuaçu, em função da amplitude e severidade de seus danos. Inviabiliza a comercialização da polpa e sementes, com prejuízo direto ao produtor. O percentual de frutos atacados tem sido alto nos plantios na Amazônia Ocidental, tanto nos cultivos em sistemas agroflorestais como em plantios solteiros (SOUZA et al., 2016; LOPES, 2000; LOPES; SILVA, 1998; THOMAZINI, 2002; SILVA; PAMPLONA 2011).

Estudos desenvolvidos por Said (2011) sobre aspectos culturais e potencial de uso do cupuaçu no estado do Amazonas, assinalam para um possível declínio da cultura na região, visto que há descrença por parte dos produtores com o cultivo da espécie. Segundo o autor, os produtores de cupuaçu sentem-se desestimulados a manterem seus cultivos por não conseguirem combater a proliferação das pragas e doenças que afetam a planta (SAID, 2011; LOPES; SILVA, 1998). O estudo não revela a proporção do desestímulo devido especificamente a broca, mas, ressalta que é altamente recomendável o investimento em pesquisas que visem práticas culturais como manejo da fertilidade do solo e controle de pragas e doenças para que a cultura volte a ter índices elevados de produtividade.

Nesse sentido, não restam dúvidas da importância de estudos que visem a avaliação dos níveis de infestação e monitoramento de insetos adultos no campo para dar suporte ao agricultor quanto ao manejo desta praga. Estudos como este podem resultar em ferramentas valiosas, pois permitem o estabelecimento de táticas de controle condizentes com o comportamento do inseto praga no campo.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida em um pomar de cupuaçuzeiro, em sistema de monocultivo de aproximadamente 2 ha, cerca de 30 anos de idade e com incidência da broca-do-fruto, sem manejo anterior da praga, localizado na Estação Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, situada no Km 29 da rodovia AM 010 (2°53' S e 59°58' W), no período de janeiro a dezembro de 2017 (Figura 3.1).

As amostras foram representadas por frutos coletados de trinta plantas, previamente selecionadas no início da safra (Figura 1C). Vinte plantas, dentre as 30, foram aleatoriamente escolhidas próximas a mata (~5 - 10 m de distância) e 10 no interior do pomar, distante da borda da floresta primária (~20 - 30 m de distância), para verificar uma possível influência da floresta na intensidade do ataque.

A coleta manual dos frutos (caídos) sob a copa das plantas foi realizada durante a safra (janeiro a abril) três vezes ao mês até o final da frutificação. Os frutos colhidos foram colocados em sacos plásticos identificados e transportados para uma área coberta com bancada instalada no campo para processamento. Após prévia contagem dos furos todos os frutos foram quebrados para avaliar a presença de larvas. Segundo Trevisan et al. (2011), ao atingir o último instar cada larva faz seu furo de saída no fruto para pupar no solo.

Para avaliar o nível de infestação os frutos foram caracterizados como sadios (sem presença de larvas ou furos) e brocados (com larvas ou furos por fruto), calculando-se o nível de infestação (NI) da broca nas plantas avaliadas: $NI (\%) = (fb / ft) \times 100$ fb = frutos brocados; ft = total de frutos (SOUZA et al., 2016).

Paralelamente ao estudo de infestação, foi realizado o levantamento e monitoramento físico de adultos da broca pela técnica do sacolejo. Esse levantamento foi desenvolvido no período de janeiro a dezembro de 2017, englobando inclusive o período da safra. As plantas selecionadas para o levantamento e monitoramento da broca foram as mesmas para o estudo de infestação.

A aplicação da técnica de sacolejo era feita três vezes ao mês. Foi utilizada uma tela plástica, de cor branca com dimensões de 8m x 3,5 m estendida no chão (Figura 3.1D), na projeção da copa da árvore que, em seguida, teve seus ramos sacodidos por 5 segundos com o auxílio de uma vara de madeira com 5m de comprimento e um gancho na extremidade (TREVISAN, 1989). Os adultos de *Conotrachelus* caídos na tela foram rapidamente contados,

sexados e levados ao laboratório de entomologia agrícola da Embrapa Amazônia Ocidental, onde foram mantidos em placa de Petri, em grupos de no máximo 10 indivíduos e alimentados com cana-de-açúcar.

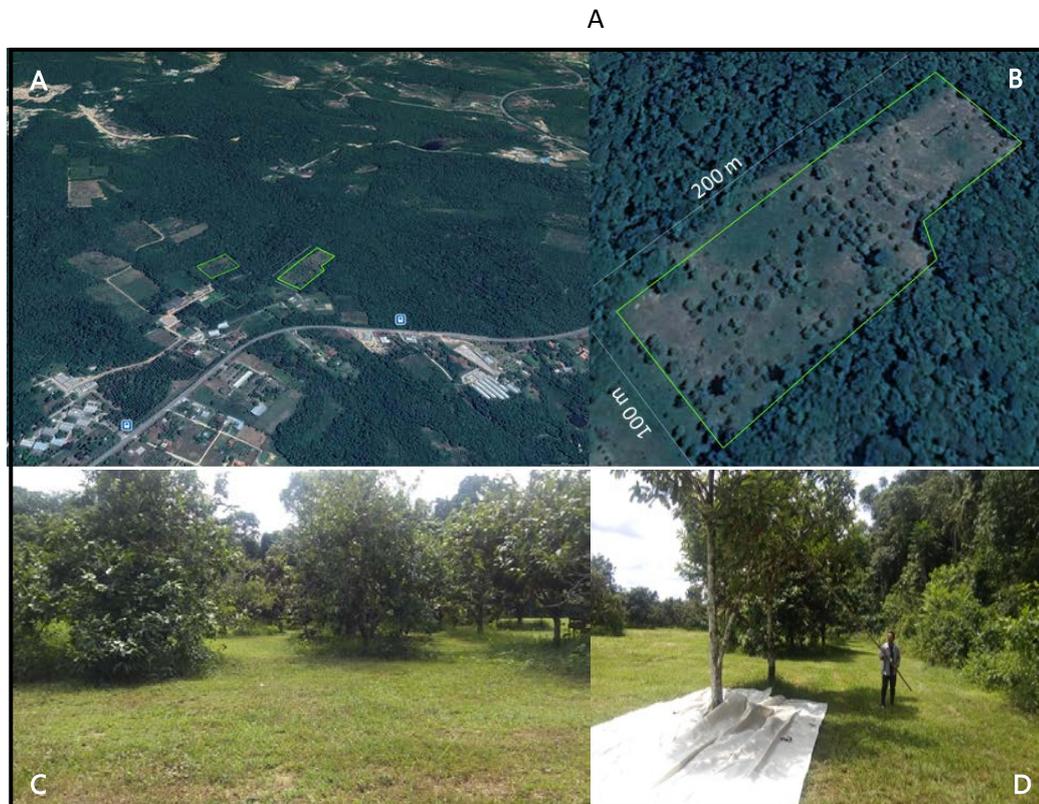


Figura 3. 1 Área experimental utilizada para coleta de insetos e voláteis de plantas de cupuaçu. Estação Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, Km 29 da rodovia AM 010. Pomar Nagibão (2°53'17.39"S; 59°57'59.22"O). A e B, vista aérea do pomar Nagibão e sua dimensão em volta da floresta. C, plantas de cupuaçu e D, sacolejo de plantas de cupuaçu localizadas na borda da floresta.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O nível de infestação alcançou 46% dos frutos produzidos durante a safra, com média de 4 brocas por fruto (Tabela 3.1). Praticamente, metade da produção de frutos foi comprometida com o ataque da broca. O que normalmente acontece com pomares antigos de cupuaçu e atacados por *C. humeropictus*.

A maior porcentagem de infestação da broca ocorreu no mês de abril (78%) que também apresentou a maior intensidade de infestação ($4,62 \pm 0,84$ larvas/fruto). Ressalta-se porém, que as fêmeas de *C. humeropictus* ovipõem em frutos a partir de dois meses de idade, portanto, no início da frutificação que acontece nos meses de novembro a dezembro

(TREVISAN, 1989; TREVISAN et al., 2011; SILVA et al., 2016). A aferição da presença de larvas nesta fase inicial de desenvolvimento dos frutos de cupuaçu, torna-se extremamente difícil. Assim, o registro de infestação desta broca torna-se mais exequível quando os frutos de cupuaçu estão totalmente maduros; fase em que caem ao solo.

A porcentagem de frutos atacados teve um pico em janeiro (59%) e abril (78%) coincidindo com os valores de N° médio de larvas/fruto de 4,54 e 4,62, respectivamente (Tabela 3.1).

A maior porcentagem de frutos brocados no mês de abril, pode ser explicado pela alta população de insetos adultos obtidos na copa das plantas nos meses de janeiro a março (Figura 3.4). Especificamente no mês de abril os frutos permaneceram sob a copa das árvores e ao final do mês foram quebrados. Provavelmente esse período, sob a copa das árvores, foi suficiente para o completo desenvolvimento e saída das larvas dos frutos, conseqüentemente melhor aferição do número de larvas pelo número furos presentes, tendo em vista que em diversos frutos recém colhidos e quebrados não se constata a presença de furos e/ou larvas pequenas (não visíveis) (TREVISAN; MENDES, 1991; MENDES et al., 1997; AGUILAR; GASPAROTTO, 1999). O número de larvas que abandonam os frutos, medido pelo número de orifícios de saídas pode ser o dobro do número de larvas presentes no fruto (THOMAZINI, 2002).

Tabela 3. 1 Número total de frutos infestados, número total de insetos adultos coletados no sacolejo, média de larvas de *Conotrachelus humeropictus* e de orifícios de saída de larvas por fruto de cupuaçu, em área experimental da Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus, AM. 2017

Mês	Nº de frutos avaliados	Nº de frutos infestados	Infestação (%)	Nº de machos coletados	Nº de fêmeas coletadas	Nº médio de larvas/fruto ¹
Jan	207	123	59	39	31	4,54 ± 0,82
Fev	386	187	48	38	35	4,15 ± 0,75
Mar	323	106	33	43	22	3,73 ± 0,69
Abr	105	82	78	21	18	4,62 ± 0,84
Total	1021	478	46	141	106	4,26

¹Estimativa correspondente ao somatório total de larvas pequenas (< 1,1 cm); larvas médias (entre 1,1 e 1,4 cm); larvas grandes (>1,4 cm) e número de orifícios de saída das larvas encontradas no fruto. Um orifício significa uma broca que saiu do fruto. ± erro padrão

Nas plantas próximas a mata, a infestação foi de 53% contra 41% das plantas localizadas no interior do pomar (Tabela 2). Esses dados corroboram com outros estudos realizados por Laker e Trevisan (1992), Oliveira (1997), Lopes e Silva (1998), Aguiar (1999) e Thomazini (2002).

Tabela 3. 2 Número total de frutos avaliados, número de frutos broqueados, porcentagem média de frutos de cupuaçu atacados e número total de adultos de *Conotrachelus humeropictus* coletados pelo sacolejo em área experimental da Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus, AM. 2017.

Mês	Próxima a mata (20 plantas)			Sacolejo	Interior do pomar (10 plantas)			Sacolejo
	Frutos	Broca	%	Nº	Fruto	Broca	%	Nº
Jan	131	81	62	59	76	42	55	11
Fev	224	140	63	68	162	47	29	05
Mar	230	77	33	63	93	29	31	02
Abr	58	44	76	35	47	38	81	04
Total	643	342	53	225	378	156	41	22

Fonte: o próprio autor

Um total de quatrocentos insetos adultos de *C. humeropictus* foram coletados entre os meses de janeiro a dezembro de 2017 (Figura 3.2). Aproximadamente 65% desses insetos foram encontrados entre os meses de janeiro a abril (safra), período este, historicamente, mais chuvoso, de menor temperatura e maiores médias de umidade relativa do ar, segundo os dados agroclimatológicos, registrados pela Estação Agroclimatológica Convencional da Embrapa Amazônia Ocidental (SCARAZATTI; ANTONIO, 2016) (Figura 3.3).

Entre os meses de maio a outubro houve um declínio na população de adultos nas plantas de cupuaçu, com um pequeno pico no mês de novembro. Os poucos insetos encontrados neste período possivelmente são os remanescentes dos últimos frutos atacados e caídos da safra (Figura 3.4). Ao que tudo indica, esses insetos aparecem exclusivamente para reprodução e depois migram para a floresta. Infere-se que estes adultos alimentam-se e talvez infestam hospedeiros alternativos como o cupuí (*Theobroma subincanum* Mart) e cacauí (*Theobroma speciosum*, Willd. ex Spreng) (SMITH; FLESSEL 1968, LAFLEUR et al., 1987, PIÑERO et al., 2001).

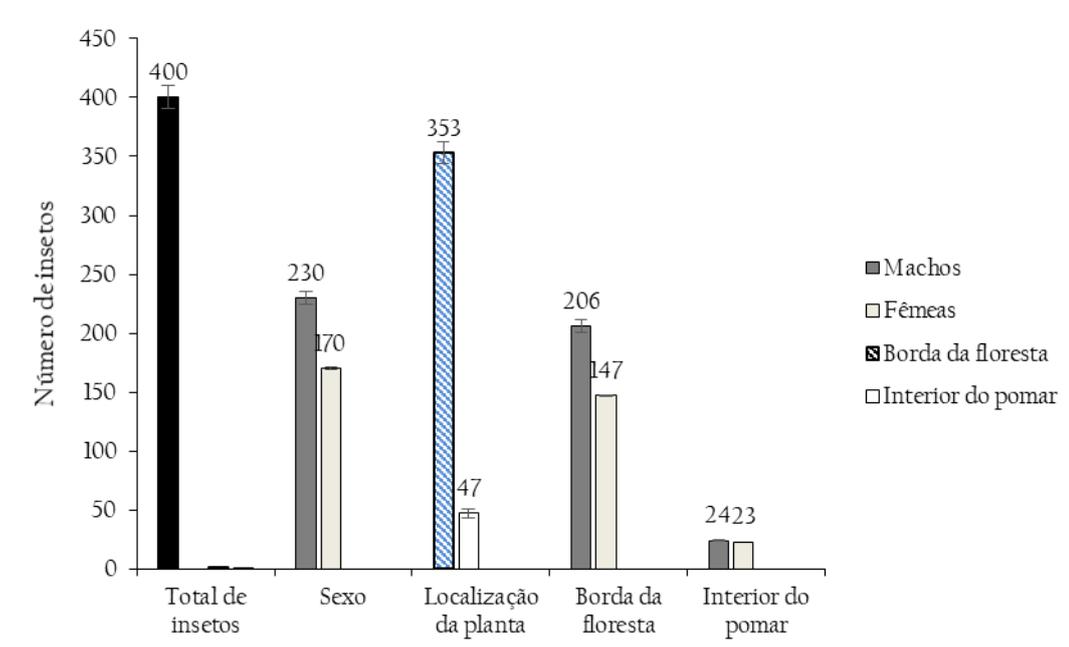


Figura 3. 2 Número total de machos e fêmeas adultos de *C. humeropictus* coletados no período de janeiro a dezembro de 2017, amostradas pelo método do sacolejo, em 30 cupuaçuzeiros componentes de um monocultivo, com e sem mata ao redor. Manaus, AM.

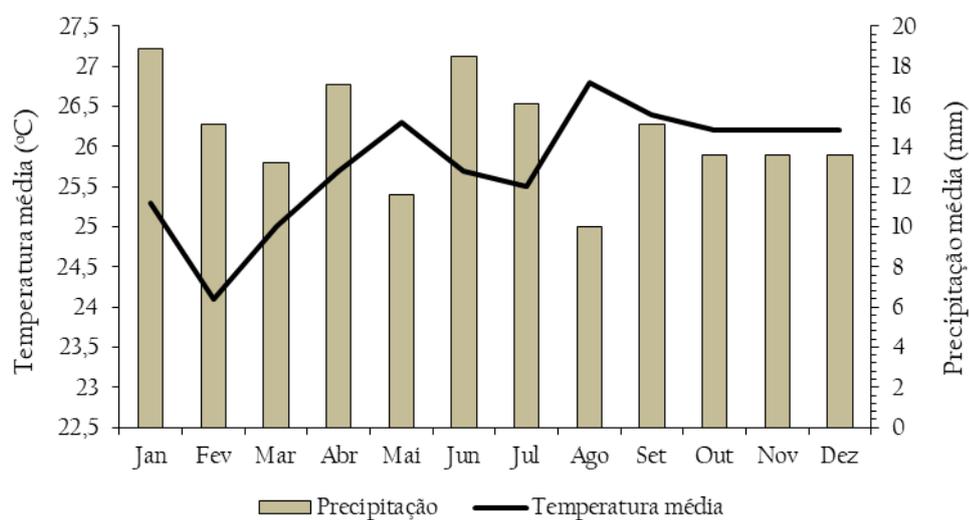


Figura 3.3 Precipitação pluviométrica e temperatura médias observadas na Estação Agroclimatológica Convencional da Embrapa Amazônia Ocidental - CPAA durante o ano de 2017. Manaus, AM.

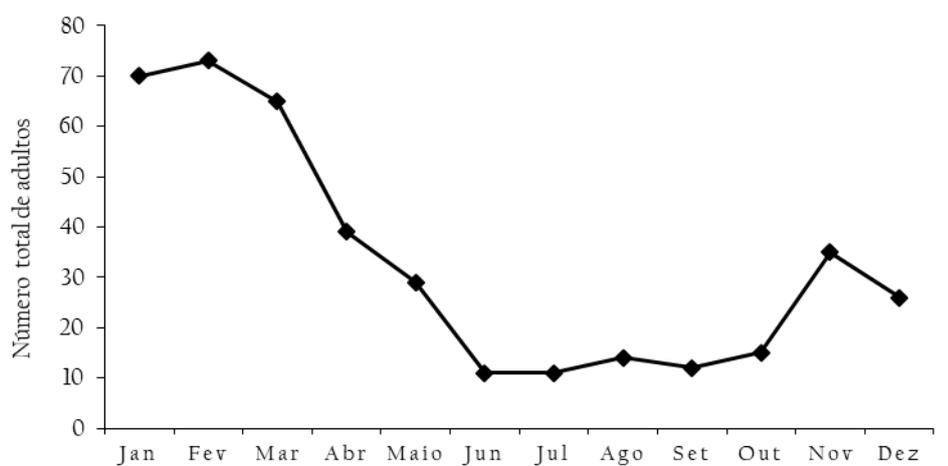


Figura 3. 4 Levantamento e monitoramento de adultos de *Conotrachelus humeropictus* no período de janeiro a dezembro de 2017, amostradas pelo método do sacolejo, em 30 cupuaçuzeiros componentes de um monocultivo. Manaus, AM.

Nas lavouras cacaueiras de Rondônia, Trevisan (1989) e Mendes e Trevisan (1991) constataram a ocorrência de *C. humeropictus* sobre as plantas independentemente de sua fase de desenvolvimento, em todos os meses do ano, sendo que as maiores populações de adultos são observadas nos períodos de junho/julho, setembro/outubro e dezembro, enquanto que as maiores infestações de larvas estão diretamente relacionadas aos picos de frutificação.

O número de insetos coletados nas plantas adjacentes a mata foi aproximadamente sete vezes maior às plantas dentro do pomar (Figura 3.2 e Figura 3.5). Estudos desenvolvidos por Thomazini (2002) e Oliveira (2003) na região do projeto: Reflorestamento Econômico Consorciado Adensado - RECA, divisa dos estados do estado do Acre, Amazonas e Rondônia, relatam que as plantas amostradas próximas a mata, apresentaram um número de adultos maior que aquelas amostradas no interior do pomar. Explica ainda, que, essa diferença populacional (com mata e sem mata), não significa, em geral, um aumento na porcentagem de frutos broqueados. Para os autores, o papel da mata na população da broca deve ser melhor elucidado.

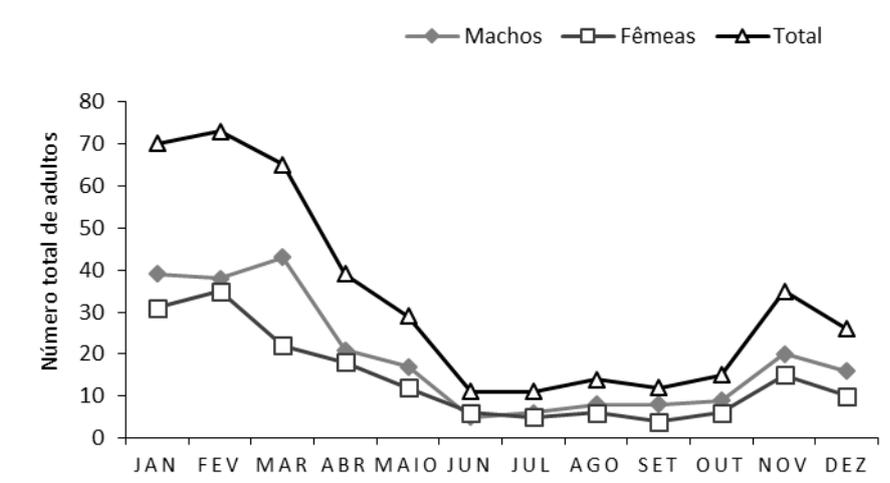


Figura 3. 5 Levantamento e monitoramento físico de adultos de *Conotrachelus humeropictus* em plantas adjacentes a mata e dentro do pomar, no período de janeiro a dezembro de 2017, amostradas pelo método do sacolejo, em 30 cupuaçuzeiros componentes de um monocultivo. Manaus, AM.

Estudos sobre a migração, seleção de sítios de hibernação e mortalidade de *Conotrachelus nenuphar*, revelaram que a dispersão dentro do pomar é relativamente limitada e, maior na borda da floresta. Os autores sugerem que outros fatores além da árvore podem influenciar a direção da migração do curculionídeo em direção a mata. Manter um padrão de dispersão relativamente constante dentro de uma área específica pode ser uma vantagem evolutiva para a broca, isso favoreceria uma certa coesão dentro da população que aumentaria as chances de encontrar um companheiro (LAFLEUR, 1987; LOPES 2000; SOUZA et al., 2016; THOMAZINI, 2002).

A amostra total de insetos coletados esteve constituída por 57% de machos, levemente superior ao de fêmeas, tanto na borda quanto no interior do pomar, com proporção sexual aproximada de 1:1 por planta (Tabelas 3.1 e 3.2). Em tese, o potencial de dispersão das fêmeas é maior, portanto, esperava-se uma superioridade das fêmeas em relação aos machos. Geralmente as fêmeas são maiores que os machos e assim, podem investir mais energia para explorar o seu ambiente (THOMSON, 1932; LAFLEUR, 1987; MAIA et al., 1999; MENDES et al., 1997).

Fica evidente o elevado nível de infestação natural desta praga constatado neste estudo. Para Aguilar (1999), isso compromete a produtividade da cultura exigindo conhecimento e aplicações de técnicas agroeconômicas para que seja obtida produtividade de melhor qualidade e quantidade a fim de cobrir os investimentos realizados, e assim suprir o mercado consumidor e oferecer lucros aos produtores.

O número elevado de insetos adultos coletados no campo durante a pesquisa, revela que do ponto de vista metodológico o sacolejo pode ser adotado como uma alternativa para o levantamento e monitoramento físico de adultos de *C. humeropictus*.

5.2. CONCLUSÕES

O nível de infestação natural por larvas de adultos de *C. humeropictus* é alto, o que compromete aproximadamente metade da produção de frutos, com maior prevalência em plantas localizadas próxima a mata. Isto coincide com número elevado de adultos predominantemente durante a safra.

Como a maioria dos insetos adultos está relativamente próxima da borda da floresta, a estratégia de controle desta broca deve focar nas plantas situadas nos primeiros 10 m de mata adjacentes.

É provável que o ataque de *C. humeropictus* seja reduzido pela escolha de locais de pomares isolados ou distantes da borda da mata, habitat de “invernagem” potencial. Embora isso ainda possa ser testado, como medida de preocupação, reforça-se a recomendação de se promover o distanciamento dos pomares de cupuaçu em relação a floresta para reduzir substancialmente a infestação.

Como estratégia de monitoramento da população de adultos de *C. humeropictus* no pomar de cupuaçu, recomenda-se a adoção da técnica do sacolejo pelo seu elevado potencial de efetividade.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, J. A. D.; GASPAROTTO, L. Aspectos cronológicos e biológicos da broca-do-fruto (*Conotrachelus* sp. FIEDLER, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) no cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) e seu controle. Embrapa Amazônia Ocidental. Séries Documentos n.3. Manaus, Am. 1999. 17p.
- AGUILAR, J. A. D. Aspectos da biologia e do comportamento da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro: infestação e dano econômico em Manaus. Revista de Agricultura, v.74, p.305-316, 1999.
- ALMUDI, T.; PINHEIRO, J. O. C. Dados estatísticos da produção agropecuária e florestal do Estado do Amazonas: ano 2013. Brasília, DF: Embrapa, 2015. 103p.
- LAFLEUR, G.; HILL, S. B.; VINCENT, C. Fall migration, hibernation site selection, and associated winter mortality of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in a Québec apple orchard. J. Econ. Entomol. 80: 1152- 1172. 1987.
- LAKER, H. A.; TREVISAN, O. The increasing importance of cupuassu (*Theobroma grandiflorum* (Schum) in the Amazon Region of Brasil. Cocoa Growers Bulletin, p.45-52, 1992.
- LOPES, C. M.D.´A. Biologia, comportamento e flutuação populacional da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro *Conotrachelus* sp. próximo *humeropectus* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE). 2000. 90p. Tese. (Doutorado em Entomologia) - INPA-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /UFAM-Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- LOPES, C.M.D.A.; SILVA, N.M. da. Impacto econômico da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro *Conotrachelus humeropectus* (Coleóptera: Curculionidae), no Amazonas e Rondônia. An. Soc. Entomol. Brasil, Piracicaba, v. 27, n. 3, p. 481- 483.1998.
- MAIA, D. S.; COLEN, B. O.; PEREIRA, F. F.. Aspectos biológicos da broca-do-cupuaçuzeiro (*Conotrachelus humeropectus* Fieldler, 1940) (Coleoptera: Curculionidae). In: XVIII SEMINÁRIO FINAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2009, PORTO VELHO. A pesquisa em Rondônia: Celebrando os 18 anos do Programa de Iniciação Científica, 1999. v. XXIII. p. 41-47.
- MENDES, A.C. de B.; TREVISAN, O. Flutuação populacional de *Conotrachelus humeropectus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae), broca dos frutos do cacauzeiro *Theobroma cacao* L. In: COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA. Informe de Pesquisas 1989/1990. Boletim: CEPLAC, 1991. p.27-29.
- MENDES, A.C.; MAGALHAES, B. P.; OHASHI, O. S. Biology of *Conotrachelus humeropectus*, Fiedler, 1940. (Coleoptera: Curculionidae), pest of Cocoa and Cupuassu fruits in Brazilian Amazon. En: Acta Amazônica. Vol. 27. No. 2. Manaus, Brasil: Instituto Nacional de Pesca de la Amazonia (INPA). p. 135-144. 1997.

MULLER, C. H.; CARVALHO, J. E. U. Sistemas de propagação e técnicas de cultivo do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). In: Seminário Internacional sobre pimenta-do-reino e cupuaçu, 1. 1996, Belém-PA. Anais... Belém: Embrapa Amazônia Oriental/JICA, 1997. 440p. (Documentos, 89).

OLIVEIRA, C. H. A experiência do projeto RECA no plantio de cupuaçuzeiro, no beneficiamento e na comercialização dos frutos. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE PIMENTA-DO-REINO E CUPUAÇU, 1., Boletim, 1996. Anais. Belém: EMBRAPA, Amazônia Oriental/JICA, 1997. p.199-206. (Documentos, 89).

OLIVEIRA, S. P. Dispersão Horizontal da Broca-do-Fruto do Cupuaçuzeiro (*Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) em Sistemas Agroflorestais de Nova Califórnia, Rondônia. 2003. 83p. Dissertação - Universidade Federal do Amazonas.

PIÑERO, J. C.; WRIGHT, S. E.; Prokopy, R. J. Response of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) to odor baited traps near woods. J. Econ. Entomol. 94: 1386-1397, 2001.

SAID, M. M. Aspectos culturais e potencial de uso do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng. Schum.) no estado do Amazonas. 2011. 136p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente) - UFAM, Manaus.

SCARAZATTI, B.; ANTONIO, I. C. Boletim agrometeorológico 2012: Estação Agroclimatológica da Embrapa Amazônia Ocidental, no Km 29 da Rodovia AM-010. Manaus, CPAA, 2016. 32p. (Boletim Técnico).

SILVA, N. M. DA; PAMPLONA, A. M. S. R. Impacto da entomofauna nos cultivos de cupuaçuzeiro. In: Seminário de Entomologia e acarologia Agrícola na Amazônia, 1 2011, Manaus. Resumos... Manaus: Sociedade Entomológica do Brasil, 2011. p. 184-204.

SILVA, N. M.; D. A.; ADAIME, R.; ZUCCHI, R. A. (2016). Pragas Agrícolas e florestais na Amazônia. Brasília: EMBRAPA.

SMITH, E. H.; J. K. FLESSEL. Hibernation of the plum curculio and its spring migration to host trees. J. Econ. Entomol. 61: 193-203. 1968.

SOUZA, A. G. C.; PAMPLONA, A. M. S. R.; COSTA, J. N. M. Estudo de caso: infestação da broca-do- cupuaçu (*Conotrachelus* sp.) em área adjacente à mata. In: X Congresso Brasileiro de Sistema Agroflorestais, 2016, Cuiabá. Anais do X Congresso Brasileiro de Sistema Agroflorestais, 2016.

TREVISAN, O.; MOURA, J. I. L.; DELABIE, J. H. C.; MENDES, A. C. B. Manejo integrado das pragas do cacauzeiro. Porto Velho, RO: CEPLAC, 2011.

TREVISAN, O. Comportamento da broca dos frutos do cacau *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Col.: Curculionidae), em Rondônia. Piracicaba, 1989. 57p. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

TREVISAN, O.; MENDES, A. C. B. Ocorrência de *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) em frutos de cupuaçu *Theobroma grandiflorum* Schum (Sterculiaceae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 13, 1991, Recife. Resumos... Recife: SEB, 1991. p.137.

VENTURIERI, G.A; ALVES, M.L.B.; NOGUEIRA, M.Q. O Cultivo do cupuaçuzeiro. Informativo SBF, Campinas, v.4, n.1, p.15-17, 1985.

THOMAZINI, M. J. Flutuação populacional e intensidade de infestação da broca-dos-frutos em cupuaçu. Scientia Agricola, Piracicaba, v. 59, n.3, p. 463-468, 2002.

THOMSON, J. R., Jr. Sex differentiation of adults of *Conotrachelus nenuphar*. J. Econ. Entomo. 25: 807-810, 1932.

CONCLUSÕES GERAIS

A broca-do-fruto do cupuaçu pela sua forma e natureza de ataque, constitui numa das pragas agrícolas mais difíceis de controle efetivo.

Os resultados obtidos neste estudo, possibilitaram uma melhor compreensão dos mecanismos de comunicação química e de alguns aspectos comportamentais de adultos de *C. humeropictus*. Esta espécie por apresentar comportamento fitofágico de broqueamento, em que estruturas vegetais são usadas como “escudos biológicos”, constitui uma categoria de praga que desafia os esforços de pesquisa e inovação, na busca de soluções que resultem no seu efetivo controle.

Os feromônios produzidos pelos machos de *C. humeropictus* coletados de população no Amazonas, na região de Manaus é constituído por um composto majoritário - o ácido grandisoico e, dos compostos minoritários grandilure I (grandisol) e grandilure II.

Estes compostos quando associados aos voláteis liberados pelo cupuaçu (caïromônios), principalmente aqueles voláteis produzidos pela planta na fenofase de frutificação, constituem em importante fonte de atração da broca-do-fruto. Assim, é provável que o recrutamento de novos indivíduos de *C. humeropictus* junto ao pomar do cupuaçuzeiro, seja estimulado pelo sinergismo desses “compostos químicos específicos” com voláteis emitidos por plantas de cupuaçuzeiro.

O maior nível de infestação natural encontrado neste estudo ocorre principalmente em plantas relativamente próxima da borda da floresta. É provável que o ataque de *C. humeropictus* seja reduzido pela escolha de locais de pomar isolados ou distantes da borda da mata, habitat de “invernagem” potencial.

Estudos devem ser ampliados, sobre o sincronismo dos compostos químicos atrativos produzidos por adultos da broca-do-fruto, correlacionando com os aspectos fenológicos e os compostos químicos liberados pelas plantas de cupuaçuzeiro. Ainda há dúvidas quanto ao potencial sinérgico dos compostos produzidos pelos insetos e plantas de cupuaçuzeiro e outros fatores que participam como mediadores e amplificadores das complexas relações intra e interespecíficas.

Pelos resultados obtidos neste trabalho, abre-se novas perspectivas quanto ao uso desses compostos, como alternativa de controle e uma ferramenta a ser adotada na estratégia do manejo integrado de *C. humeropictus*.

Para o sucesso dessa estratégia no efetivo controle desta broca dentro de um contexto de MIP, é necessário que pesquisas em ecologia química venham a ter continuidade. Estudos sobre a biologia e comportamento da broca, além de avaliações individuais e combinadas de semioquímicos encontrados serão necessários.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, J.A.D.; GASPAROTTO, L. Aspectos cronológicos e biológicos da broca-do-fruto (*Conotrachelus* sp. Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) no cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) e seu controle. Embrapa Amazônia Ocidental. Séries Documentos n.3. Manaus, Am. 1999. 17p.
- AKOTSEN-MENSAH, C.; BOOZER, R.; FADAMIRO, H.Y. Field evaluation of traps and lures for monitoring plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in Alabama Peaches. *J Econ Entomol* 103(3):744–753, 2010.
- ALMEIDA, C.M.V.C. de; ALMEIDA, C.F.G. Coleta de cacau silvestre no Estado de Rondônia. *Revista Theobroma*, v.17, n.2, p.65-92, 1987.
- ALMUDI, T.; PINHEIRO, J. O. C. Dados estatísticos da produção agropecuária e florestal do Estado do Amazonas: ano 2013. Brasília, DF: Embrapa, 2015. 103p.
- ALVERSON, W.S.; WHITLOCK, B.A.; NYFFELER, R.; BAYER, C.; BAUM, D.A. Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhF* sequence data. *Am. J. Bot.* 86:1474-1486, 1999.
- ALVES, R. M.; FILGUEIRAS, G. C.; HOMMA, A.K.O. Aspectos socioeconômicos do cupuaçuzeiro na Amazônia: do extrativismo a domesticação. In: SANTANA, A. C. (ed.). Mercado, cadeias produtivas e desenvolvimento rural na Amazônia. 1.ed. Belém, PA: UFRA. p.197-223, 2014.
- ALVES, R. M. Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schum., por marcadores microsatélites e descritores botânico-agronômicos. 2002. 146p. Dissertação (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2002.
- AMBROGI, B. G.; VIDAL, D. M.; ZARBIN, P. H. G.; ROSADO-NETO, G. H. Feromônios de agregação em Curculionidae (Insecta: Coleoptera) e sua implicação taxonômica. *Química Nova* (Impresso), v. 32, p. 2151-2158, 2009.
- AGELOPOULOS, N.; BIRKETT, M.; HICK, J.; HOOPER, A.; PICKETT, J.; POW, E.; SMART, L.; SMUILEY, D.; WADHAMS, I.; WOODCOOK, C. Exploiting semiochemicals in insect control. *Pesticide Science*, 55, 225–235, 1999.
- ARIOLI, C.; CARVALHO, G.; BOTTON, M. Monitoramento de *Grapholita molesta* (Busck)(Lepidoptera: Tortricidae) na cultura do pessegueiro com feromônio sexual sintético. *BioAssay*, v. 1, 2009.
- BARBOSA, W.C.; NAZARÉ, R.F.R.; NAGATA, I. Estudo tecnológico de frutas da Amazônia. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1978. 10p. (Comunicado Técnico, 3).

BARTELT, R. J.; Weevils. In: HARDIE, J.; MINKS, A. K. (eds.) Pheromones of Non-Lepidopteran Insects Associated with Agricultural Plants. CABI Publishing: Wallingford, cap. 5, 1999.

BENTO, J. M. S.; PARRA, J. R. P.; MIRANDA, S. H. G. de; ADAMI, A.C.O. How much is a pheromone worth? 2016. F1000 Res 5:1763

BLANDE, J. D. Chapter Eleven-Plant Communication With Herbivores. Advances in Botanical Research, v. 82, p. 281-304, 2017.

BLASSIOLI-MORAES, M. C.; BORGES, M.; LAUMANN, R. A; MAGALHÃES, D.M.; VIANA, A R; Miranda, JE; Birkett, M. Semiochemicals from plants and insects on the foraging behaviour of natural enemies.. Pesquisa Agropecuária Brasileira (Online), v. 51, p. 454-464, 2016.

BONDAR, G. Curculionídeos do gênero *Conotrachelus* nocivos ao cacauzeiro. Rodriguésia, Rio Janeiro, v.2, n.8, p.41-43, 1937.

BONDAR, G. Notas Entomológicas da Bahia VIII. Rev. de Entomol. 12(3):433- 435, 1941.

BONDAR, G. Notas entomológicas da Baía. XIV. Rev. Entomol., Petrópolis, v. 15, n. 1-2, 191-204, 1944.

BOOTH, RG., COX, ML. and MADGE, RB., 1990. 3. Coleoptera IIE. Guides to insects of importance to man. Cambridge: Cambridge University Press. 384 p

BORDEN, J. H. Disruption of semiochemical-mediated aggregation in bark beetles, p. 421–438, 1997. In: R. T. Cardé and A. K. Minks (eds.). Pheromone Research: New Directions. Chapman & Hall, New York.

BORDEN, J. H. Strategies and tactics for the use of semiochemicals against forest insect pests in North America. In: LUMSDEN, R. D.; VAUGHN, J. L. (Ed.). Pest management: Biologically based technologies. Washington, DC: Am. Chem. Soc., p. 265-279. 2003.

BORGES, M.; BLASSIOLI-MORAES, M. C.; LAUMANN, R. A. ECOLOGIA QUÍMICA APLICADA A AGROPECUÁRIA. In: 61ª Reunião Anual da Sociedade Interamericana de Horticultura Tropical, 2015, Manaus. Livro de resumo da 61ª Reunião Anual da Sociedade Interamericana de Horticultura Tropical, 2015. v. 1. p. 51-54.

BORGES, M.; MORAES, M. C. B.; PEIXOTO, M. F.; PIRES, C. S. S.; SUJII, E. R.; LAUMANN, R. A. Monitoring the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) with pheromonebaited traps in soybean fields. Journal of Applied Entomology, v. 135, n. 1-2, p. 68-80, Feb. 2011.

BORGES, M.; BLASSIOLI-MORAES. M.C.; LAUMANN, R.A.; SOUZA, A.C.; COSTA, E.L.; SILVA, N.M. Semioquímicos uma ferramenta sustentável para o controle de insetos na agricultura da região Amazônica – Um estudo de caso para a broca do cupuaçuzeiro *Conotrachelus humeropictus* (Coleoptera: Curculionidae). In: Souza et al., 2017. Bioecologia e estratégias de controle da broca-do-cupuaçu *Conotrachelus humeropictus* (Coleoptera: Curculionidae). Manaus, AM. Embrapa, 2017.

BOTTON, M.; NAVA, D. E.; ARIOLI, C. J.; GRUTZMACHER, A. D.; GARCIA, M. S. (2011). Bioecologia, monitoramento e controle da mariposa-oriental na cultura do pessegueiro no Rio Grande do Sul. Embrapa Uva e Vinho-Circular Técnica (INFOTECA-E).

BOTTON, M.; ARIOLLI, C. J. COLLETA, V. D. Monitoramento da mariposa oriental *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) na cultura do pessegueiro. Embrapa Uva e Vinho-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2001.

BUTENANDT, A.; BECKMANN, R.; STAMM, D.; HECKER, E. Über den Sexual-Lockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und Konstitution Z. Naturforsch B, 14, 283–284, 1959.

BRUCE, T.; PICKETT, J. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects – Finding the right mix. *Phytochemistry*, 72, 1605–1611, 2011.

CALZAVARA, B.B.G. Fruteiras: abieiro, abricozeiro, bacurizeiro, biribazeiro, cupuaçuzeiro. IPEAN, Série: Culturas da Amazônia. Belém, 1970, 42p.

CALZAVARA, B.B.G.; MULLER, C.H.; KAHWAGE, O.N.C. Fruticultura tropical: O cupuaçuzeiro. Cultivo, beneficiamento e utilização do fruto. EMBRAPA-CPATU, Documentos, 32. Belém. 101p. 1984.

CARLETTO, G.M. O número de cromossômios em cacauzeiros. Ilhéus: Instituto de cacau da Bahia, 1946. P.35-39. (Boletim Técnico, 6).

CASTRO, A.P. de; FRAXE, T. de J.P.; SANTIAGO, J.L.; MATOS, R.B.; PINTO, I.C. Os sistemas agroflorestais como alternativa de sustentabilidade em ecossistemas de várzea no Amazonas. *Acta Amazônica*, v.39, p.279-288, 2009.

CAVALCANTE, P.B. Frutas comestíveis na Amazônia. 7 a ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2010. 282p. (Coleção Adolpho Ducke).

CERDA, H.; FERNANDEZ, G.; LOPEZ, A.; VARGA, J. Olfactory Attraction of the Sugar Cane Weevil (Coleoptera: Curculionidae) to Host Plant Odors, and Its Aggregation Pheromone. *Fla. Entomol.* 82(1):103-112, 1999.

CERUTI, F. C. Interações entre feromônios de insetos e semioquímicos de plantas. *Rev. Acad., Curitiba*, 5(1), 73-82, 2007.

CHAAR, J.M. Composição do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) e conservação de seu néctar por meios físicos e químicos. Rio de Janeiro, 1980. 87p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

CLEMENT, C. R. 1492 e a perda de recursos genéticos de culturas amazônicas. I. A relação entre domesticação e declínio da população humana. *Botânica econômica* 53: 188 - 202. 1999.

COSTA, J. N. M.; FRANÇA, L. L. A. de; BORILE, D.; TREVISAN, O.; SOUZA, A. das G. C. de; PAMPLONA, A. M. S. R. Performance de inseticidas no controle da broca-do-cupuaçu

(*Conotrachelus humeropictus*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE INTERAMERICANA DE HORTICULTURA TROPICAL, 61., 2015, Manaus. Anais... Brasília, DF: Embrapa, 2015. p. 101.

COOK, M.S.; ZEYAU, R.K.; PICKETT, J.A. The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annual Review of Entomology*, 52: 375-400, 2007.

COOMBS, A. Trap designs and attractants for monitoring plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst). 2001. P 214. M.Sc. Dissertation. Michigan State University, East Lansing, 2001.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Bulletin of the United States National Museum. Smithsonian Institution Press, Washington*, 35: 379-614. 1964.

DICKENS, J.C. Green leaf volatiles enhance aggregation pheromone of boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Entomol. Exp. Appl.* 52:191-203, 1989.

DUCKE, A. As espécies brasileiras de cacau (Gênero *Theobroma* L.), na botânica sistemática e geografia. *Rodriguésia, Rio de Janeiro*, v. 4, n. 13, p. 265-283, 1940.

EHRlich, P. R.; RAVEN, P.H. Borboletas e plantas: um estudo em coevolução. *Evolução* 18: 586-608, 1964.

ELLER, F. J.; BARTELT, R. J. Grandisoic acid, a male-produced aggregation pheromone for the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*. *Journal of Natural Products*, v. 59, p. 451-453, 1996.

FALCÃO, M. A.; LLERAS, E. Aspectos fenológicos, ecológicos e de produtividade do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd ex Spreng Schum). *Acta Amazônica*, v.13, n.5/6, p.725-735, 1983.

FEARNside, P. M. (1989) Agricultura na Amazônia. Tipos de Agricultura: padrão e tendências. Na Trilha dos Grandes Projetos: modernização e conflito na Amazônia. *Cadernos do NAEA* 10. Castro, E & Hebette, J. (org.). Gráfica e Editora da UFPA. Belém, PA. 197 – 252 p.

FIEDLER C., 1940. Monograph of the South American weevils of the genus *Conotrachelus*. London: British Museum (Natural History), v -1- 365 p.

FIGUEIRÊDO, F. J. C.; FERREIRA, C. DA S.; DA ROCHA NENTO, O. G. Aspectos biofísicos de cupuaçuzeiros cultivados ao sol e à sombra. *Embrapa Amazônia Oriental. Boletim de pesquisa e desenvolvimento*, 2002.

FIGUEIRÊDO, F. J. C.; FERREIRA, C. das S.; ROCHA NETO, O. G. da; SILVA, E. S. A. Taxa Fotossintética de Cupuaçuzeiros Cultivados ao Sol e à Sombra. In: *Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17. 2002, Belém, PA. Anais. Belém: SBF, 2002. 4 f., 2005.

FRÍAS, R.; ADELA, ALICIA. O estudo dos semioquímicos responsáveis da interação entre a guayaba (*Psidium guajava* L) e o picudo da guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall. 2015. Tesis de Doctorado em Ciências Químicas. Universidad Nacional de Colômbia, Bogotá, Colômbia, 2015.

GARCIA, M.V. B; PAMPLONA, A. M. S. R.; MORAES, L. A. C. Pragas do cupuaueiro: I - A broca-do-fruto. Manaus: EMBRAPA, Amazônia Ocidental, 1997. Folder.

GARCIA, J. J. S.; TREVISAN, O.; MENDES, A. C. de B. Estudo da migração de *Conotrachelus humeropictus* em lavouras de cacau em RO. In: CEPLAC. Departamento Especial da Amazônia. Informe de Pesquisas 1988. Belém, p.28.

GILBLIN-DAVIS, R.M., WEISSLING, T.J., OEHLISCHLAGER, A.C., GONZALEZ, L.M. Field Response of *Rhynchophorus cruentatus* (Coleoptera: Curculionidae) to its Aggregation Pheromone and Fermenting Plant Volatiles . Fla. Entomol. 77(1):164-177, 1994.

GONDIM, T. M. de S.; THOMAZINI, M. J.; CAVALCANTE, M. J. B.; SOUZA, J. M. L. Aspectos da produção de cupuaçu. Embrapa Acre-Documentos (INFOTECA-E), 2001. 43p.

GOULART, H. F.; LIMA, M. R. F.; MORAIS, R. K. S.; BERNARDO, V. B. Feromônios: Uma alternativa verde para o Manejo Integrado de Pragas. Revista Virtual Química, Niterói-RJ, v.7, n.4, p.1205-1224, 2015.

HARARI, A.; LANDOLT, P. Orientation of sugar rootstalk borer weevil, *Diaprepes abbreviatus*, to weevil frass and food odors. Journal of Chemical Ecology, 23, 857–868, 1997.

HELMS, A. M.; DE MORAES, C. M.; TOOKER, J. F.; MESCHER, M. C. Exposure of *Solidago altissima* plants to volatile emissions of an insect antagonist (*Eurosta solidaginis*) deters subsequent herbivory. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110, 199-204, 2013.

HOCK, V., CHOUINARD, G., LUCAS, E., CORMIER, D., LESKEY, T.C., ZHANG, A. Olfactometer responses of plum curculio *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) to host plant volatiles, synthetic grandisoic acid, and live conspecifics. Journal of Insect Behavior, p. 1-20, 2017.

HOMMA, A. K. O.; CARVALHO, R. A.; MENEZES, A. J. E. A. Extrativismo e plantio racional de cupuaçuzeiros no sudeste paraense: a transição inevitável. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 39. Recife, 2001. Anais. Brasília: SOBER, 2001.

HUNT, D. W. A.; RAFFA. K. F. Attraction of the pine root collar weevil, *Hylobius radicis*, and the pitch-eating weevil, *Pachylobius picivorus* (Coleoptera: Curculionidae), to ethanol and turpentine in pitfall traps. Environ. Entomol. 18:351-355, 1989.

JOHNSON, A. W.; HAYS, S.B. Laboratory Mating Behavior of the Plum Curculio. J. Econ. Entomol. 62: 438-440, 1969.

JAFFÉ, K.; SANCHEZ, P.; CERDA, H.; URDANETA, N.; HERNANDEZ, J.V.; JAFFÉ, R.; MARTINEZ, R.; MIRAS, B. Chemical ecology of the palm weevil *Rhynchophorus*

palmarum L. (Coleoptera: Curculionidae): Attraction to host plants and to male produce aggregation pheromone. J. chem. Ecol. 19(8):1703-1720, 1993.

JANSSON, R.; MASON, L.; HEATH, R.; SORENSEN, K.; HAMMOND, A.; ROBINSON, J. Pheromone trap monitoring system for sweet potato weevil in the southern United States: Effects of trap type and pheromone dose. J. Econ. Entomol. 85:416-423, 1992.

JUNIOR, J. F. S. Alterações fisiológicas em cupuaçuzeiros sadios e infectados por vassoura de bruxa. Nucleus, v. 8, n. 1, 2011.

KESSLER, A. The information landscape of plant constitutive and induced secondary metabolite production. Current Opinion in Insect Science, 8, 47-53, 2015.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. Science, v. 291, n. 5511, p. 2141-2144, 2001

KLASCHKA, U. Chemical communication by infochemicals. Environmental Science and Pollution Research, 16, 367-369, 2009.

LESKEY, T.C.; WRIGHT, S.E. Monitoring Plum Curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae), Populations in Apple and peach Orchards in the Mid-Atlantic. J. Econ. Entomol. 97(1):79-88, 2004.

LESKEY, T. C.; WRIGHT, S. E.; HOCK, V.; CHOUINARD, G.; CORMIER, D.; LEAHY, K.; COOLEY, D.; TUTTLE, A.; EATON, A.; ZHANG, A. Avaliando respostas eletrofisiológicas e comportamentais a voláteis para melhorar o manejo de armadilhas de armadilha de odor *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae). Environ Entomol 43 (3): 753-761, 2014.

LIMA, E. R.; DELLA LUCIA, T. M. C. Biodinâmica dos feromônios. In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. (Eds.). Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 13-25.

LOPES, C. M. D. A. Biologia, comportamento e flutuação populacional da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro *Conotrachelus* sp. próximo *humeropectus* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE). 2000. 90p. Tese. (Doutorado em Entomologia) - INPA-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /UFAM-Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

LOPES, C. M. D.; SILVA, N. M. Impacto econômico da broca do Cupuaçu, *Conotrachelus humeropectus* Field (Coleoptera: Curculionidae) nos Estados do Amazonas e Rondônia. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v. 27, n.3, p. 481-483, 1998.

MAGALHÃES, D. M.; BORGES, M.; LAUMANN, R. A.; WOODCOCK, C. M.; PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A.; BLASSIOLI-MORAES, M. C. Influence of two acyclic homoterpenes (tetranorterpenes) on the foraging behavior of *Anthonomus grandis* Boh. Journal of Chemical Ecology, 42, 305-313, 2016.

MAGALHÃES, D. M.; BORGES, M.; LAUMANN, R. A.; SUJII, E. R.; MAYON, P.; CAULFIELD, J. C.; BLASSIOLI-MORAES, M. C. Semiochemicals from herbivory induced

cotton plants enhance the foraging behavior of the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Journal of Chemical Ecology*, 38, 1528-1538, 2012.

MENDES, A. C. B.; GARCIA, J. J. S.; TREVISAN, O. Ocorrência de coleobrocas nos frutos do cacauzeiro em Rondônia. *Informe Fitossanitário*, v. 2, p. 1-3, 1982.

MENDES, A. C. B.; RIBEIRO, N.C.; GARCIA, J. de J.; TREVISAN, O. Danos de *Conotrachelus humeropictus*, Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) nova praga de cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) na Amazônia brasileira. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.17, p.19-28, 1988.

MENDES, A. C. B. 1996. *Biologia e controle microbiano de Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae). Tese de Doutorado, Universidade Federal do Pará/Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará. 101 p.

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

MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; PAREJA, M.; SERENO, F. T. P. S.; MIHCEREFF, M. F. F.; BIRKET, M. A.; PICKETT, J. A.; BORGES, M. Attraction of the stink bug egg parasitoid to defence signals from soybean activated by treatment with cis-jasmone. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Amsterdam, v. 131, n. 2, p. 178-188, 2009.

MORAES, M. C. B.; THOMAZINI, M. J.; LAUMANN, R. A.; CAVALCANTE, A. das; BORGES, M. Estudos preliminares da ecologia química da broca do cupuaçu, *Conotrachelus humeropictus* Fiedler (Coleoptera: Curculionidae). In: 9 Simpósio de Controle Biológico, 2005, Recife - PE. *Anais Palestras e Mesas Redondas*, 2005. p. 126.

MORAES, V.H.F.; MULLER, C.H.; SOUZA, A.G.C.; AN-TÔNIO I.C. Native fruit species of economic potential from the Brazilian Amazon. *Ang. Bot.* v. 68, p. 47-52, 1994.

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

MOSCARDI, F.; SOUZA, M.L. de; CASTRO, M.E.B. de; MOSCARDI, M.L.; SZEWCZYK, B. Baculovirus pesticides: Present state and future perspectives... In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL, J. (Ed.). *Microbes and microbial technology agricultural and environmental applications....* Springer Science Business, 2011. p. 415-445.

NAZARÉ, R. F. R. de; BARBOSA, W.C.; VIÉGAS, R.M.F. *Processamento das sementes de cupuaçu para a obtenção de cupulate*. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1990. 38p. (EMBRAPA-CPATU. Boletim de Pesquisa, 8).

MESQUITA A. L. M. *Importância e métodos de controle do “moleque” ou broca-do-rizoma-da-bananeira*. Circular Técnica 17 Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, Brasil, 2003.

MULLER, C. H.; CARVALHO, J.E.U. Sistemas de propagação e técnicas de cultivo do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). In: Seminário Internacional sobre pimenta-do-reino e cupuaçu, 1., 1996, Belém-PA. Anais... Belém: Embrapa Amazônia Oriental/JICA, 1997. 440p. (Documentos, 89).

O'BRIEN, C. W.; COUTURIER, G. Two New Agricultural Pest Species of *Conotrachelus* (Coleoptera: Curculionidae: Molytinae) In South America. Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.), 31(3):227-235, 1995.

OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A.M.; MENDES, S.M.; FRIZZAS, M.R. Crop losses and economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. Crop Prot 56:50–54, 2014.

PALACIO-CORTES, A. M.; VALENTE, F.; SAAD, E.B.; TROGER, A.; FRANCKE, W.; ZARBIN, P.H.G. (1 R,2S,6R)-Papayanol, Aggregation Pheromone of the Guava Qeevil, *Conotrachelus psidii*. J Braz Chem Soc 26 : 784—789, 2015.

PARADIS, R. O. Observations sur le cycle évolutif du charançon de la prune, *Conotrachelus nenuphar* (Hbst.) sur la pomme dans le Québec. Ann. Entomol. Soc. Que., v.2, p.60-70, 1956.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. Current Opinion in Plant Biology, v. 5, n. 3, p. 237-243, 2002.

PHILLIPS, T., JIANG, X., BURKHOLDER, W., PHILIPS, J., TRAN, H. Behavioral responses to food volatiles by two species of stored-product Coleoptera, *Sitophilus oryzae* and *Tribolium castaneum*. J. Chem. Ecol. 19:723-734, 1993.

PINTO-ZEVALLOS, Delia M.; ZARBIN, Paulo H.G. A química na agricultura: perspectivas para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis. Quim Nova, v. 36, p. 1509-1513, 2013.

PINTO-ZEVALLOS D. M., MARTINS C. B. C., PELLEGRINO A. C., ZARBIN P. H. G. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. Química Nova 36: 1395–1405. 2013.

PRANCE, G. T.; SILVA, M. F. Árvores de Manaus. Manaus: INPA, 1975. p.249-250.

PROKOPY, R.; COOLEY, S.; PHELAN, P. Bioassay approaches to assessing behavioural responses of Plum curculio adults (Coleoptera: Curculionidae) to host odour. Journal of Chemical Ecology, 21, 1073–1084, 1995.

PROKOPY, R. J., PHILLIPS, T. W., VARGAS, R.I., JANG, E.B. Defining sources of Coffee Plant Odor Attractive to *Ceratitis captata* flies. J. Chem. Ecol. 23:577- 1587, 1997.

PROKOPY, R. J.; CHANDLER, B. W.; DYNOK, S.A.; PIÑERO, J.C. Odor-Baited Trap Trees: A new approach to Monitoring Plum Curculio (Coleoptera: Curculionidae). J. Econ. Entomol. 96(3):826-834, 2003..

RIFFEL, A.; DA COSTA, J. G. Os voláteis de plantas e o seu potencial para a agricultura. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. 48 p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1953; 201).

RIBEIRO, N.C.A.; SACRAMENTO, C.K.; BARRETTO, W.S.; SANTOS FILHO, L.P. Características físicas e químicas de frutos de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) do sudeste da Bahia. *Agrotrópica*, v.4, n.2, p.33-37, 1992.

RIBEIRO, P.A.; SUJII, E.R.; DINIZ, I.R.; MEDEIROS, M.A.; SALGADO-LABORIAU, M.L.; BRANCO, M.C.; PIRES, C.S.S.; FONTES, E.M.G. Alternative food sources and overwintering feeding behavior of the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) under the tropical conditions of Central Brazil. *Neotropical Entomology*, v.39, n.1, p.28-34, 2010.

ROCHA NETO, O. G. da; OLIVEIRA JÚNIOR, R. C. de; CARVALHO, J. E. U. de; LAMEIRA, O. A.; SOUSA, A. R. de; MARADIAGA, J. B. G. Principais produtos extrativos da Amazônia e seus coeficientes técnicos. Brasília: IBAMA/Embrapa-CNPT, 1999. 78 p.

ROCHAT, D.; MALOSSE, C.; LETTERE, M.; DUCROT, P.H.; ZAGATTI, P.; RENO, M.; DESCOINS, M. Male-produced Aggregation Pheromone of the American Palm Weevil, *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Collection, Identification, Electrophysiological Activity, and Laboratory Bioassay. *J. Chem. Ecol.* 17:2127-2141, 1991.

RODRIGUEZ, G., CASARES, R.M. (2003) Algunos Aspectos Bioecológicos del Gorgojo del Níspero, *Conotrachelus* sp. (Coleoptera: Curculionidae). *Entomotropica* “antes/ formely Bol. Entomol. Venez.” 18(1):57-61.

SANTOS, G. M.; MAIA G. A.; SOUSA, P. M.; FIGUEIREDO, R. W.; COSTA, J. M. C.; FONSECA, A. V. V. Antioxidant activity and correlations with bioactive components from commercial products of cupuaçu. *Ciência Rural*, v.40, n.7, p.1636-1642, jul, Fortaleza, CE, 2010.

SEYBOLD, S. J.; VANDERWEL, D. Biosynthesis and endocrine regulation of pheromone production in the Coleoptera, p. 137–200, in G. J. Blomquist and R. G. Vogt (eds.), *Insect pheromone biochemistry and molecular biology*. Elsevier Academic Press, London. 2013.

SHULAEV, V.; SILVERMAN, P.; RASKIN, I. Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*, v. 386, n. 6626, p. 738, 1997.

SILVA, N. M.; D.A.; ADAIME, R.; ZUCCHI, R. A. (2016). *Pragas Agrícolas e florestais na Amazônia*. Brasília: EMBRAPA.

SILVA, N. M. DA; PAMPLONA, A. M. S. R. Impacto da entomofauna nos cultivos de cupuaçuzeiro. In: *Seminário de Entomologia e acarologia Agrícola na Amazônia*, 1 2011, Manaus. Resumos... Manaus: Sociedade Entomológica do Brasil, 2011. p. 184-204.

SILVA FILHO, G. Semioquímicos envolvidos na interação gorgulho-da-goiaba (*Conotrachelus psidii* Marshall) - goiabeira (*Psidium guajava* L.). 2005. 83p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Darcy Ribeiro, 2005.

SILVA, N.M.; ALFAIA, S.S. Manejo integrado da broca-do fruto do cupuaçuzeiro (Coleoptera: Curculionidae) em sistemas agroflorestais. Projeto RECA Nova California. Cascalho Editora INPA – Rondônia, 2004.

SMITH, E. H. A method or rearing the plum curculio under laboratory conditions induing some biological observations. *J. Econ. Entomol.* v.50, p. 187-90, 1957.

SOBHY, I. S.; ERB, MATTHIAS.; LOU, YONGGEN.; TURLINGS, T. C. J. The prospect of applying chemical elicitors and plant strengtheners to enhance the biological control of crop pests. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 369, n. 1639, p. 20120283, 2014.

SOUZA, A. G. C. S.; SILVA, S.E.L.; TAVARES, A.M. RODRIGUES, M. do R. L. A cultura do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.). Embrapa Amazônia Ocidental-Circular Técnica (INFOTECA-E), 1999.

SOUZA, A. G. C. Boas práticas agrícolas da cultura do cupuaçuzeiro. Manaus: Embrapa Amazônia Oriental. 56 p. 2007.

SOUZA, A. das G. C. de; SOUZA, M. G. de; PAMPLONA, A. M. S. R.; WOLFF. Boas práticas na colheita e pós-colheita do cupuaçu. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2011. 8p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Circular técnica, 36).

SOUZA, A. das G. C.; SOUZA, R. N. Banco Ativo de Germoplasma de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng. Schum.)). In: WORKSHOP PARA CURADORES DE BANCO DE GERMOPLASMA DE ESPÉCIES FRUTIÍFERAS, 1., Brasília, 1997. Anais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. p. 107-113

SOUZA, A. das G.C.; SOUZA, N. R.; SILVA, S. E. L.; NUNES, C. D. M.; CANTO, A. C.; CRUZ, L. A. A. Fruteiras da Amazônia. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1996. 204P.

SZCZERBOWSKI, D. T.; GABRIELA G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; TREVISAN, O.; GOMES, S. M. S.; TRÖGER, A.; MORI, K.; FRANCKE, W.; ZARBIN, P. H. G. (1R,6R)-2,2,6-Trimethyl-3-oxabicyclo[4.2.0]octan-4-one, a new monoterpene lactone produced by males of the cocoa borer *Conotrachelus humeropictus* (Col.: Curculionidae). *Tetrahedron Letters* , v. 57, p. 2842-2844, 2016.

TESTASECCA, S. R. A situação da *Cydia pomonella* no cone sul: Avaliação das normas e do programa nacional de erradicação no Brasil. Viçosa, MG, 2013. Universidade Federal de Viçosa, 2013, 95p. Dissertação (Mestrado em Defesa Sanitária Vegetal).

TEDDERS, W. L.; PAYNE, A. J. Biology, life history, and control of *Conotrachelus schoofi* (Coleoptera: Curculionidae) on pecans. *J. Econ. Entomol.* v.79, n.2, p. 490-96, 1986.

TEIXEIRA, C. A. D.; GERALDA, M. Cupuaçu: controle das principais pragas e doenças. Porto Velho: EMBRAPA-CPAF, 1997. Folder.

TEWARI, S.; LESKEY, T.C.; NIELSEN, A. L.; PIÑERO, J. C.; RODRIGUEZ-SAONA, C.R. Use of pheromones in insect pest management, with special attention to weevil

pheromones. In: Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspectives. D.P. Abrol (Ed.). Elsevier Inc. p.141-168, 2014.

THE PHEROBASE. Data base of insect pheromones and semiochemicals. Disponível em: <<http://www.pherobase.com/>>. Acesso em: 20 set. 2017.

THOMAZINI, M. J. Flutuação populacional e intensidade de infestação da broca dos frutos em cupuaçu. *Scientia agricola*, Piracicaba v. 59, n. 3, p. 463-468, set., 2002.

THOMAZINI, M. J. A broca dos frutos do cupuaçuzeiro, *Conotrachelus humeropictus* Fiedler. Comunicado Técnico N° 113. Rio Branco. EMBRAPA, 2000. Documentos. Manaus, n. 3, p. 17, 1999.

TIGLIA, E. A., VILELA, F., MOURA, J. I. L., LIMA, E. R. Captura de *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera Curculionidae) com Substâncias Atrativas e Feromônio. In: XV Congresso Brasileiro de Entomologia, Caxambu, MG, 1995.

TORRENS, G. G. Feromônio de *Conotrachelus humeropictus* (Coleoptera: Curculionidae): identificação e avaliação da atividade comportamental. 2015. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Entomologia)) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

TREVISAN, O.; MOURA, J. I. L.; DELABIE, J. H.C.; MENDES, A. C. B. Manejo Integrado das Pragas do Cacaueiro do Estado de Rondônia. 1. ed. Porto Velho - RO: CEPLAC, 2011. v. 1. 38p.

TREVISAN, O.; MENDES, A. C. B. Ocorrência de *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) em frutos de cupuaçu *Theobroma grandiflorum* Schum (Sterculiaceae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 13, 1991, Recife. Resumos... Recife: SEB, 1991. p.137.

TUMLINSON, J. H.; HARDEE, D. D.; GUELDNER, R. C.; THOMPSON, A. C.; HEDIN, P. A.; MINYARD, J. P. Sex pheromones produced by male boll weevil. *Science*, 166, 1010–1012, 1969.

VENTURIERI, G. A. Floral Biology of Cupuassu (*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Sprengel) Schumann). 1994. 206p. Thesis (Ph.D.) – University of Reading, 1994.

VENTURIERI, G.A. Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos e processamento. Belém. Clube do Cupu, 1993. 108p.

VENTURIERI, G.A.; AGUIAR, J.P.L. Composição do chocolate caseiro de amêndoas de cupuaçu *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum. *Acta Amazônica*, 18, 3-8, 1988.

VENTURIERI, G. A; ALVES, M. L. B.; NOGUEIRA, M. Q. O Cultivo do cupuaçuzeiro. Informativo SBF, Campinas, v.4, n.1, p.15-17, 1985.

VERHEGGEN, F.; ARNAUD, L.; BARTRAM, S.; GOHY, M. HAUBRUGE, E. Aphid and plant volatiles induce oviposition in an Aphidophagous hoverfly. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 301–307, 2008.

VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T. M. C. Introdução aos semioquímicos e terminologia. In: VILELA E.F. & DELLA LUCIA, T. M. C. (eds.) Feromônio de insetos: biologia, química e aplicação. Ribeirão Preto: Holos, cap. 1, p. 9-12, 2001.

WEBER, D. C.; MORRISON, W. R.; KHRIMIAN, U. M. A.; ARROZ, K. B.; LESKEY, T. C.; RODRIGUEZ-SAONA, C.; NIELSEN, A. L. E.; BLAAUW, B. R. Ecologia química de *Halyomorpha alys*: Descobertas e aplicações. *J. Pest Sci.* 90: 989-1008, 2017.

WEBSTER, B.; BRUCE, T.; DUFOUR, S.; BIRKEMEYER, C.; BIRKETT, M.; HARDIE, J.; PICKETT, J. Identification of volatile compounds used in host location by the black bean aphid, *Aphis fabae*. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 1153–1161, 2008.

WHALON M, NORTMAN D, WISE J, GUT L, EPSTEIN D. Plum curculio management and spray timing. Michigan State Univ Fruit CAT Newsletter, 21, 1–3, 2006.

WHITFORD, F. The pesticide marketplace. USA, 2009. <<https://www.extension.purdue.edu/extmedia/PPP/PPP-71.pdf>>. Acesso em: 20 dezembro, 2017).

WITT, L.G. Estratégias fitossanitárias adotadas em pomares de macieira no sul do Brasil e sua relação com a resistência da *Grapholita molesta* (BUSK, 1916) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE). Curitiba, PR, 2016. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016, 56p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

WITZGALL, P.; KIRSCH, P.; CORK, A. Sex Pheromones and Their Impact on Pest Management. *Journal of Chemical Ecology*, 36, 80-100, 2010.

WOOD, D. L. The role of pheromones, kairomones, and allomones in the host selection and colonization behavior of bark beetles. *Annual Review of Entomology*, v. 27, p. 411-446, 1982.

WRIGHT, G. A.; LUTMERDING, A.; DUDUREVA, N.; SMITH, B. H. Intensity and the ratios of compounds in the scent of snapdragon flowers affect scent discrimination by honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Physiology A*, v. 191, n. 2, p. 105-114, 2005.

WYATT, T. D. Introduction to chemical signaling in vertebrates and invertebrates. In: Mucignat-Caretta, C. (Ed.), *Neurobiology of Chemical Communication*, *Frontiers in Neuroscience Series*. CRC Press/Taylor and Francis, pp. 1–22, 2014.

ZHANG, Q. H.; SCHLYTER, F. Olfactory recognition and behavioural avoidance of angiosperm nonhost volatiles by conifer-inhabiting bark beetles. *Agric. Forest Entomol.* 6:1–19, 2004.