

RODOLFO MOLINÁRIO DE SOUZA

**COMPOSTOS VOLÁTEIS DE *Costalimaita ferruginea* (FAB.) (COLEOPTERA:
CHRYSOMELIDAE) E DE SUA PLANTA HOSPEDEIRA, *Eucalyptus* SPP.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S729c
2013

Souza, Rodolfo Molinário de, 1978-

Compostos voláteis de *Costalimaita ferruginea* (Fab.)
(Coleoptera: Chrysomelidae) e de sua planta hospedeira,
Eucalyptus spp. / Rodolfo Molinário de Souza. – Viçosa, MG,
2013.

xv, 87f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Norivaldo dos Anjos Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.71-87.

1. Besouro-amarelo-do-eucalipto. 2. Eucalipto.
3. Semioquímicos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Entomologia. Programa de Pós-Graduação em
Entomologia. II. Título.

CDD 22. ed. 595.7648

RODOLFO MOLINÁRIO DE SOUZA

**COMPOSTOS VOLÁTEIS DE *Costalimaita ferruginea* (FAB.) (COLEOPTERA:
CHRYSOMELIDAE) E DE SUA PLANTA HOSPEDEIRA, *Eucalyptus* spp.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 05 de julho de 2013.

Antônio Jacinto Demuner

Cassiano Sousa Rosa

Eliseu José Guedes Pereira

Eraldo Rodrigues Lima
(Coorientador)

Norivaldo dos Anjos Silva
(Orientador)

Todos os dias quando acordo,
Não tenho mais o tempo que passou
Mas tenho muito tempo:
Temos todo o tempo do mundo.

Todos os dias antes de dormir,
Lembro e esqueço como foi o dia:
“Sempre em frente
Não temos tempo a perder”.
(...)

Renato Russo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de executar e concluir esse trabalho, pois com Ele pude ter força, coragem e dedicação para concretizar mais esta etapa de minha vida.

À minha mãe que lutou uma vida para me educar e formar meu caráter e que hoje faz parte de mais essa conquista, que segundo ela e com o meu aval, conseguimos juntos vencer mais essa caminhada. Obrigado mãe, pelo seu amor incondicional, por ter me mostrado o melhor caminho a seguir e por estar sempre ao meu lado.

Ao meu orientador, Prof. Norivaldo dos Anjos, que independente de qualquer tipo de preconceito sempre acreditou no meu potencial, me incentivou a ir além e ao partilhar a sua experiência contribuiu de forma significativa para o meu crescimento profissional.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade oferecida. À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela acolhida, paciência e compreensão (principalmente pelos atrasos). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa que favoreceu a realização dessa caminhada de quatro anos.

Aos membros da banca de qualificação e desta tese Eraldo Rodrigues Lima, José Henrique Schoereder, Maria Augusta, Edival Zauza, Antônio Jacinto Demuner, Cassiano Sousa Rosa e Eliseu José Guedes Pereira pela disponibilidade e sugestões.

Ao meu coorientador, Eraldo Rodrigues Lima, que se prontificou a me coorientar, liberou meu acesso ao Laboratório de Semioquímicos e Comportamento de Insetos, disponibilizando toda a estrutura necessária para a execução de grande parte desse trabalho.

Às secretárias Dona Paula, Miriam e Cláudia pela eficiência, dedicação e paciência.

Aos estagiários e amigos Estela R. Durães, Isaac Jorge e Iris Cristiane Magistrali pelo apoio, confiança e amizade.

À estagiária do Laboratório de Semioquímicos e Comportamento de Insetos, Natália Ribas, que me auxiliou na execução dos ensaios eletroantegráficos.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Semioquímicos e Comportamento de Insetos, Carla Arce, Silvana A. S. Souza, Alexandre e Sandra Mara, pelas contribuições, suporte e convivência durante a realização das coletas de voláteis.

Aos colegas da Casa de Cupins, Gláucia Cordeiro, Carolina Rocha, Pedro Emílio, Carlos Matrangolo e Pedro Guilherme pelas contribuições, sugestões nos trabalhos, convivência (quase diária) e suporte durante a coleta de material no campo.

Aos proprietários do sítio onde foram feitas as coletas de besouros por duas temporadas seguidas. À Suzano Papel e Celulose pelo suporte técnico e financeiro.

Aos professores da Graduação e da pós que contribuíram para a minha formação, principalmente aos professores com os quais eu desenvolvi algum tipo de trabalho acadêmico, Cláudia Butarello Gentile, Laercio Jacovine, Mônica Josense, Eraldo Lima, Ana Maria Bailez e Norivaldo dos Anjos.

Aos meus amigos de pós-graduação, Camila Moreira, Mateus Toshiba, Daniel Albeny, Lívia Ataíde, Paulo Cristaldo, Carla Arce, Silvia Menezes, Sabrina Almeida, Natália Maria e Luiza Carla pelos momentos inesquecíveis de descontração. Em especial, à minha amiga Juliana Novelli que esteve ao meu lado no momento mais difícil do doutorado e que com grande carinho, atenção e dedicação me acompanhou e sofreu junto comigo, rumo à reta final.

À minha prima Jordana, pela amizade, carinho e paciência ao longo desses anos e, principalmente, pelo apoio. Ao meu irmão, que me tem como exemplo, e aos demais familiares, principalmente minha prima Núbia e minha Tia Bidu que sempre acreditaram em meu potencial.

À minha amiga e irmã Nathalie, pela força, companheirismo e dedicação.

Aos amigos de Viçosa pelos desabafos, amizades e momentos inesquecíveis de descontração.

Em especial ao meu companheiro, amigo e confidente que viveu tudo isso ao meu lado, aguentou meus estresses e me deu força pra seguir em frente, com ele ao meu lado eu faria tudo de novo, mas agora vamos seguir rumo a novos desafios.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
Feromônios em Chrysomelidae (Insecta: Coleoptera)	1
1.1. Introdução	2
1.2. Feromônios de Chrysomelidae.....	3
1.2.1. Feromônios de longo alcance	3
1.2.2. Feromônios de contato	14
Constituintes químicos presentes em voláteis de adultos de <i>Costalimaita ferruginea</i> (Coleoptera: Chrysomelidae) e de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i>.....	20
2.1. Introdução	21
2.2. Material e Métodos.....	23
2.2.1. Insetos.....	23
2.2.2. Espécie vegetal hospedeira	23
2.2.3. Coleta dos voláteis	23
2.2.4. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)	24
2.2.5. Identificação dos compostos.....	25
2.3. Resultados	25
2.3.1. Compostos exclusivamente liberados nos tratamentos com insetos adultos	29
2.3.2. Compostos liberados pelo eucalipto sem ataque, mas que foram detectados em outros tratamentos	31
2.3.3. Compostos liberados pelo eucalipto durante e após a herbivoria	34
2.3.4. Compostos não identificados	37
2.4. Discussão	37
Resposta eletroantenográfica de <i>Costalimaita ferruginea</i> (Fabricius, 1801) (Coleoptera: Chrysomelidae) aos componentes voláteis de coespecíficos e da planta hospedeira.....	42
3.1. Introdução	43
3.2. Material e Métodos.....	46
3.2.1. Insetos.....	46
3.2.2. Espécie vegetal hospedeira	46
3.2.3. Coleta de voláteis	46
3.2.4. Eletrofisiologia.....	47
3.2.5. Cromatografia gasosa e espectrometria de massa	49
3.2.6. Identificação dos compostos.....	49

3.2.7. Análises estatísticas.....	49
3.3. Resultados	50
3.3.1. Composto 1	51
3.3.2. Composto 2.....	53
3.3.3. Composto 3.....	55
3.3.4. Composto 4.....	57
3.3.5. Composto 5.....	59
3.3.6. Composto 6.....	62
3.4. Discussão	64
CONCLUSÕES GERAIS.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura dos compostos encontrados nos feromônios de longo alcance de Chrysomelidae. Fonte: El-Sayed (2013). * O composto apresenta diferentes isômeros que desencadeiam diferentes respostas em diferentes espécies e/ou subespécies. 14
- Figura 2.** Estrutura dos compostos bioativos do feromônio sexual de contato produzido nos élitros de fêmeas de *Gastrophysa atrocyanea*. 16
- Figura 3.** Cromatógrafo em fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massa (GC-EM - Shimadzu, modelo QP2010). Viçosa/MG, 2012. 25
- Figura 4.** Cromatogramas representativos dos voláteis coletados de (A) ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* sem adultos de *Costalimaita ferruginea* (ES) e de (B) fêmeas adultas se alimentando nos ramos de eucalipto (F+E). Viçosa/MG, 2012. α -Pineno (7); β -Pineno (8); Sulcatona (9); β -Mirceno (10); Decano (11); Octanal (12); α -Felandreno (13); Acetato de (3Z)-hexenila (14); Isobutirato de isoamila (15); α -Terpineno (16); o-Cimeno (17); Limone (18); Eucaliptol (19); (Z)- β -Ocimeno (20); (E)- β -ocimeno (22); δ -Terpineno (23); α -Terpinoleno (25); Undecano (27); Linalool (28); Nonanal (29); (3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (30); allo-Ocimeno (31); neo-allo-Ocimeno (32); Borneol (35); Benzoato de Etila (36); Terpinen-4-ol (37); Butirato de (3Z)-hexenila (38); α -Terpineol (39); Dodecano (40); Salicilato de metila (41); Metilchavicol (42); Decanal (43); Geraniol (44); Geranial (46); Tridecano (47); 2-Butiloctanol (49); Bicicloelemeno (50); Acetato de α -terpinila (51); α -Cubebeno (52); Acetato de geranila (53); α -Copaeno (54); Tetradecano (55); β -Cubebeno (56); β -Elemeno (57); α -Gurjuneno (59); β -Cariofileno (60); Benzoato de Isoamila (61); β -Gurjuneno (62); Geranil acetona (63); Cadina-3,5-dieno (64); α -Cariofileno (65); Allo-Aromadendreno (67); δ -Gurjuneno (68); Pentadecano (69); Biciclogermacreno (70); α -Muuroleno (71); γ -Cadineno (72); Cubebol (73); δ -Cadineno (74); trans-Cadina-1,4-dieno (75); Heptadecano (77); Tetradecanoato de etila (79); Octadecano (80); Acetato de (2E,6E)-farnesila (81); Heneicosano(83); ND - Não identificado. 27
- Figura 5.** Cromatogramas representativos dos voláteis coletados de (A) machos adultos de *Costalimaita ferruginea* se alimentando de ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* (F+E) e de (B) ramos de eucalipto após a alimentação dos besouros (EA). Viçosa/MG, 2012. α -Pineno (7); β -Pineno (8); Sulcatona (9); β -Mirceno (10); Decano (11); Octanal (12); α -Felandreno (13); Acetato de (3Z)-hexenila (14); Isobutirato de isoamila (15); α -Terpineno (16); o-Cimeno (17); Limone (18); Eucaliptol (19); (Z)- β -Ocimeno (20); 2-Feniletanol (21); (E)- β -ocimeno (22); δ -Terpineno (23); Octan-1-ol (24); α -Terpinoleno (25); Undecano (27); Linalool (28); Nonanal (29); (3E)-

4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (30); allo-Ocimeno (31); neo-allo-Ocimeno (32); Borneol (35); Benzoato de Etila (36); Terpinen-4-ol (37); Butirato de (3Z)-hexenila (38); α -Terpineol (39); Dodecano (40); Salicilato de metila (41); Metilchavicol (42); Decanal (43); Geraniol (44); Geranial (46); Tridecano (47); Indol (48); 2-Butiloctanol (49); Bicicloelemeno (50); Acetato de α -terpinila (51); α -Cubebeno (52); Acetato de geranila (53); α -Copaeno (54); Tetradecano (55); β -Cubebeno (56); β -Elemeno (57); α -Gurjuneno (59); β -Cariofileno (60); Benzoato de Isoamila (61); β -Gurjuneno (62); Geranil acetona (63); Cadina-3,5-dieno (64); α -Cariofileno (65); Allo-Aromadendreno (67); Pentadecano (69); Bicyclgermacreno (70); α -Muuroleno (71); γ -Cadineno (72); Cubebol (73); δ -Cadineno (74); trans-Cadina-1,4-dieno (75); Heptadecano (77); Octadecano (80); Acetato de (2E,6E)-farnesila (81); Heneicosano(83); ND - Não identificado. 28

Figura 6. Cromatogramas representativos dos voláteis coletados de (A) fêmeas (F) e de (B) machos (M) de *Costalimaita ferruginea*. Viçosa/MG, 2012. α -Pineno (7); β -Pineno (8); Sulcatona (9); Decano (11); Octanal (12); Limone (18); Eucaliptol (19); (Z)- β -Ocimeno (20); Undecano (27); Nonanal (29); α -Terpineol (39); Dodecano (40); Salicilato de metila (41); Decanal (43); Tridecano (47); α -Cubebeno (52); α -Copaeno (54); Tetradecano (55); β -Elemeno (57); α -Gurjuneno (59); β -Gurjuneno (62); Geranil acetona (63); Dodecanol (66); Allo-Aromadendreno (67); Pentadecano (69); α -Muuroleno (71); γ -Cadineno (72); δ -Cadineno (74); Heptadecano (77); Tetradecanoato de etila (79); Octadecano (80); Salicilato de benzila (82); ND - Não identificado..... 29

Figura 7. Cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu GC-2010 acoplado a um sistema de detecção eletroantegráfica Syntech (Hilversum, Holanda) (CG-EAD). Viçosa-MG, 2012. 48

Figura 8. Respostas eletroantegráficas de machos e fêmeas adultos de *Costalimaita ferruginea* aos compostos voláteis liberados por (A) fêmeas em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* (F+E); (B) machos em associação com ramos de eucalipto (M+E); (C) ramos de eucalipto após a alimentação dos besouros (EA); (D) fêmeas sozinhas (F); (E) machos sozinhos (M). Viçosa/MG, 2013..... 50

Figura 9. Concentração média \pm erro padrão do composto **1** nos tratamentos com fêmeas (F+E) e machos (M+E) de *Costalimaita ferruginea* em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis*, ramos de eucalipto após alimentação dos besouros (EA) e eucalipto sozinho (ES). (n=5) Colunas seguidas de letras distintas diferem significativamente (Tukey; P<0,05). 52

Figura 10. Espectro de massa referente ao composto **1** presente nos extratos de machos e fêmeas de *Costalimaita ferruginea* em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis*, ramos de eucalipto após alimentação dos besouros e de ramos de eucalipto sem ataque (A) e espectro de massa do acetato, **Acetato de (3Z)-hexenila** disponível na literatura (B) (fonte: El-Sayed 2013). 53

Figura 11. Concentração média \pm erro padrão do composto **2** presente nos tratamentos com machos de *Costalimaita ferruginea* (M), machos em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* (M+E) e de ramos de eucalipto após alimentação dos besouros (EA). (n=5) Colunas seguidas de letras distintas diferem significativamente (Tukey; P<0,05). 54

Figura 12. Espectro de massa referente ao composto **4** presente nos extratos de machos de *Costalimaita ferruginea*, machos em associação com ramos de clones híbridos de

<i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> e em extratos de ramos de eucalipto após alimentação dos besouros.....	55
Figura 13. Concentração média \pm erro padrão do composto 3 presente nos tratamentos com fêmeas (F+E) e machos (M+E) de <i>Costalimaita ferruginea</i> em associação com ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> , ramos de eucalipto após alimentação dos besouros (EA) e eucalipto sozinho (ES). (n=5) Colunas seguidas de letras distintas diferem significativamente (Tukey; P<0,05).....	56
Figura 14. Espectro de massa referente ao composto 3 presente nas amostras com extratos de machos e fêmeas de <i>Costalimaita ferruginea</i> em associação com ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> , ramos de eucalipto após alimentação dos besouros e de ramos de eucalipto sem ataque (A) e espectro de massa do estereoisômero (E,Z) do monoterpeneo, allo-Ocimeno , disponível na literatura (B) (fonte: El-Sayed, 2013).57	
Figura 15. Concentração média \pm erro padrão do composto 4 presente nos tratamentos com fêmeas de <i>Costalimaita ferruginea</i> (F), fêmeas em associação com ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> (F+E) e de ramos de eucalipto após alimentação dos besouros (EA). (n=5) Colunas seguidas de letras distintas diferem significativamente (Tukey; P<0,05).....	58
Figura 16. Espectro de massa do composto 4 presente nos extratos de fêmeas de <i>Costalimaita ferruginea</i> , fêmeas em associação com ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> e de ramos de eucalipto após alimentação dos besouros (A) e espectro de massa do aldeído, Decanal , disponível na literatura (B) (fonte: El-Sayed, 2013).....	59
Figura 17. Concentração média \pm erro padrão do composto 5 presente nos tratamentos com fêmeas (F) e machos (M) de <i>Costalimaita ferruginea</i> , fêmeas (F+E) e machos (M+E) em associação com ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> . (n=5), ramos de eucalipto após alimentação dos besouros (EA) e ramos sem ataque e sem insetos (ES). (n=5) Colunas seguidas de letras distintas diferem significativamente (Tukey; P<0,05).	61
Figura 18. Espectros de massa referentes ao composto 5 presente nos extratos de machos e fêmeas de <i>Costalimaita ferruginea</i> , machos e fêmeas em associação com ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> , ramos de eucalipto após alimentação dos insetos e de ramos sem ataque (A) e espectro de massa do sesquiterpeneo, γ-Cadineno , disponível na literatura (B) (fonte: El-Sayed, 2013).	62
Figura 19. Concentração média \pm erro padrão do composto 6 presente nos tratamentos de machos de <i>Costalimaita ferruginea</i> (M) e de machos em associação com ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> (M+E). (n=5) Colunas seguidas de letras distintas diferem significativamente (Tukey; P<0,05).	63
Figura 20. Espectro de massa referente ao composto 6 presente nos extratos de machos de <i>Costalimaita ferruginea</i> e desses em associação com ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência de feromônios de longo alcance em Chrysomelidae.....	4
Tabela 2. Compostos presentes nos voláteis coletados de fêmea e machos adultos de <i>Costalimaita ferruginea</i> sozinhos ou em associação com ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> . Viçosa-MG, 2012.....	30
Tabela 3. Compostos emitidos por ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> e que foram encontrados nos voláteis emitidos por machos e fêmeas de <i>Costalimaita ferruginea</i> durante e após a alimentação dos besouros. Viçosa-MG, 2012...	32
Tabela 4. Compostos emitidos por ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> e encontrados nos tratamentos de machos e fêmeas de <i>Costalimaita ferruginea</i> sozinhos, machos e fêmeas se alimentando do eucalipto e do eucalipto após alimentação dos besouros. Viçosa-MG, 2012.	33
Tabela 5. Compostos emitidos por ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> durante a alimentação de adultos machos (M+E) e fêmeas (F+E) de <i>Costalimaita ferruginea</i> e após a alimentação dos besouros (EA). Viçosa-MG, 2012.	35
Tabela 6. Compostos emitidos durante a alimentação de adultos machos e fêmeas de <i>Costalimaita ferruginea</i> em ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> . Viçosa-MG, 2013.	36
Tabela 7. Compostos emitidos exclusivamente por ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> após alimentação por adultos de <i>Costalimaita ferruginea</i> . Viçosa-MG, 2012.....	36
Tabela 8. Compostos não identificados presentes nos voláteis obtidos de machos (M) e fêmeas (F) de <i>Costalimaita ferruginea</i> sozinhos, machos (M+E) e fêmeas (F+E) em associação como ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> , eucalipto sozinho (ES) e após alimentação dos besouros (EA). Viçosa-MG, 2012.	37
Tabela 9. Concentrações e respostas de adultos de <i>Costalimaita ferruginea</i> ao composto 1 presente nos extratos de machos e fêmeas em associação com ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> e a ramos do eucalipto após alimentação dos insetos. Viçosa/MG, 2012.	51

Tabela 10. Concentrações e respostas de adultos de <i>Costalimaita ferruginea</i> ao composto 2 presente nos extratos de machos, machos em associação com ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. Grandis</i> , e de ramos de eucalipto após alimentação dos adultos. Viçosa/MG, 2012.	54
Tabela 11. Concentrações e respostas de adultos de <i>Costalimaita ferruginea</i> ao composto 3 presente nos voláteis de machos e fêmeas em associação com ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> e a ramos do eucalipto após alimentação dos insetos.	55
Tabela 12. Concentrações e respostas de adultos de <i>Costalimaita ferruginea</i> em relação ao composto 4 presente nas amostras de extratos de fêmeas, fêmeas em associação com ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> e de ramos de eucalipto após alimentação dos besouros. Viçosa/MG, 2012.	58
Tabela 13. Concentrações e respostas de adultos de <i>Costalimaita ferruginea</i> em relação ao composto 5 presente nas amostras com extratos de machos, fêmeas, machos e fêmeas em associação com ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> e de ramos de eucalipto após alimentação dos besouros. Viçosa/MG, 2012.	60
Tabela 14. Concentrações e respostas de adultos de <i>Costalimaita ferruginea</i> em relação ao composto 6 presente nas amostras com extratos de machos e de machos em associação com ramos de clones híbridos de <i>Eucalyptus urophylla</i> vs. <i>E. grandis</i> . Viçosa/MG, 2012.	63

RESUMO

SOUZA, Rodolfo Molinário de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Compostos voláteis de *Costalimaita ferruginea* (Fab.) (Coleoptera: Chrysomelidae) e de sua planta hospedeira, *Eucalyptus* spp.** Orientador: Norivaldo dos Anjos Silva. Coorientadores: Eraldo Rodrigues de Lima, Paulo Sérgio Fiuza Ferreira, Hélio Garcia Leite e José Lino Neto.

O gênero *Eucalyptus* contém algumas das espécies madeireiras mais cultivadas ao redor do mundo. No Brasil, a área plantada com esse gênero atingiu em 2012, a quantidade de 5,1 milhões de hectares. Entretanto, como qualquer outra espécie vegetal cultivada, os plantios de eucalipto são frequentemente alvos de insetos daninhos. O besouro-amarelo, *Costalimaita ferruginea*, é um importante besouros desfolhador de eucalipto. Os adultos, que emergem logo após as primeiras chuvas, se agregam em plantios de eucalipto para se alimentarem de suas folhas e brotações novas. Na natureza são bem conhecidos diversos modelos de relações entre inseto-inseto, inseto-planta e inseto-planta-inseto, que na grande maioria das vezes, são mediadas por compostos voláteis. Entretanto, as relações inseto-inseto e inseto-planta, ainda não foram analisadas para o caso de *C. ferruginea* e sua planta hospedeira, o eucalipto. No primeiro capítulo dessa tese serão apresentados os modelos de interações inseto-inseto descritos na literatura para a família Chrysomelidae. No segundo capítulo, os voláteis liberados por adultos de *C. ferruginea*, pela sua planta hospedeira e pela associação entre os dois serão caracterizados. No terceiro capítulo as respostas aos compostos bioativos dentro desse sistema serão investigados. Assim, dois objetivos foram propostos: (i) caracterizar os voláteis liberados por adultos de *C. ferruginea* e pelo eucalipto e investigar as diferenças quali-quantitativas nos voláteis liberados durante e após a herbivoria e (ii) avaliar a resposta dos besouros a possíveis compostos bioativos liberados por coespecíficos, planta hospedeira e a associação entre os dois. Para o primeiro objetivo, os voláteis foram obtidos através da técnica de coleta em *headspace* e analisados por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). Para o

segundo objetivo, a resposta das antenas dos insetos foi analisada utilizando-se a técnica da antenografia acoplada à cromatografia gasosa (EA-CG). Nos voláteis emitidos pelo besouro-amarelo, alguns compostos foram considerados fortes candidatos a feromônio para esse inseto. Dois deles foram produzidos exclusivamente pela fêmea sozinha ou durante a alimentação no eucalipto e outros dois foram produzidos pelos machos de forma similar, mas tais compostos não foram identificados. A constituição dos voláteis emitidos pela planta sem ataque seguiu um padrão já observado e relatado na literatura, com o composto **Eucaliptol** o constituinte majoritário. Em termos quantitativos a associação do besouro-amarelo com o eucalipto alterou a taxa de emissão de certos compostos emitidos pelo eucalipto. Respostas eletroantegráficas foram observadas para seis compostos. Desses, quatro foram identificados como sendo **Acetato de (3Z)-hexenila**, **Allo-ocimeno**, **Decanal** e **γ -Cadineno**. Machos e fêmeas responderam prontamente a todos os compostos, com exceção do **Decanal**, em que apenas respostas de fêmeas foram detectadas. Para os dois compostos não identificados, um é liberado exclusivamente pelos machos, sozinhos ou em associação com o eucalipto, e outro além da sua presença nesses voláteis também foi detectado nos voláteis liberados pela planta após alimentação dos besouros. Esses dois compostos, mais o **γ -Cadineno**, são fortes candidatos na constituição de um feromônio de agregação. **Acetato de (3Z)-hexenila** e **Allo-ocimeno** são compostos produzidos pela planta, sendo que na presença dos insetos sua taxa de emissão foi alterada e, possivelmente, essa alteração seja percebida pelo inseto. Pesquisas futuras devem ser direcionadas para a importância desses compostos na interação inseto-inseto e inseto-planta com a finalidade de usá-los no monitoramento e controle das populações de *C. ferruginea* em plantios de eucalipto.

ABSTRACT

SOUZA, Rodolfo Molinário de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Volatile compounds of *Costalimaita ferruginea* (Fab.) (Coleoptera: Chrysomelidae) and its host plant, *Eucalyptus* spp.** Adviser: Norivaldo dos Anjos Silva. Co-advisers: Eraldo Rodrigues de Lima, Paulo Sérgio Fiuza Ferreira, Hélio Garcia Leite and José Lino Neto.

The genus *Eucalyptus* contains some of the most cultivated hardwood timber species around the world. In Brazil, the area planted with this genus reached in 2012 the amount of 5.1 million hectares. However, eucalypt plantations are often targets of pests. The eucalypt yellow beetle, *Costalimaita ferruginea*, is an important leaf-eating beetle of *Eucalyptus*. The adults that emerge after the first rains, clump of eucalypt plants to feed on their leaves and new shoots. In nature, many models of interactions between insect-insect, insect-plant and insect-plant-insect are well known. These models generally are mediated by volatile compounds. The insect-insect and plant-insect interactions have not been analyzed for the *C. ferruginea* and its host plant. In the first chapter I present an introduction to models of insect-insect interactions described in the literature for the Chrysomelidae family. In the second chapter the volatiles released by adult of *C. ferruginea*, its host plant and the association between the two were featured and in the third chapter, responses to bioactive compounds within this system were investigated. Thus, two goals were proposed: (i) to describe the volatiles released by eucalypt yellow beetle adults and eucalypts and investigate the qualitative and quantitative differences in the volatiles released during and after herbivory and (ii) to evaluate the response of beetles to possible bioactive compounds released by conspecifics, host plant and the association between both. For the first objective, the volatiles were obtained by the technique of sampling in headspace and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). For the second objective, the response of the antennae of insects was analyzed using the electroantennographic-gas

chromatography technique (EAD-GC). Some compounds emitted by eucalypt yellow beetle were considered strong candidates to an insect pheromone. Two of them were exclusively produced by the female alone or during feeding eucalypts and two others were produced in a similar manner by the male, but such compounds were not identified. The constitution of the volatiles emitted by the plant without attack followed a pattern already observed and reported in the literature, being the **Eucalyptol** the major constituent. In quantitative terms the insect-plant association altered the rate of emissions of certain compounds emitted by host plant. Electrophysiological responses were observed for six compounds. Of these, four were identified as **(3Z)-Hexenyl acetate**, **Allo-ocimene**, **Decanal** and **γ -Cadinene**. Males and females responded promptly to all compounds, except **Decanal**, in which only responses of females were detected. For the two unidentified compounds, one is exclusively released by males alone or in combination with eucalypt, and other the presence was also detected in these volatiles and in the volatiles released by the plant after feeding beetles. These two compounds, plus the **γ -Cadinene** are strong candidates in the constitution of an aggregation pheromone. **(3Z)-Hexenyl acetate** and **Allo-ocimene** are compounds produced by the plant, and in the presence of insects its emission rate was changed and possibly this change is perceived by the insect. Future research should be directed to the importance of these compounds in insect-insect and plant-insect interactions in order to use them in monitoring and controlling the populations of *C. ferruginea* in eucalypt plantations.

Capítulo **1**

Feromônios em Chrysomelidae (Insecta:
Coleoptera)

1.1. Introdução

Chrysomeloidea é basicamente representada pela família Cerambycidae cujas larvas se alimentam de madeira, e pela família Chrysomelidae (*lato sensu*) que se alimenta basicamente de partes verdes da planta, sendo que recentemente a família Bruchidae (besouros de semente) foi incluída dentro de Chrysomelidae como uma nova subfamília (Bruchinae) (JOLIVET & VERMA, 2002). Os crisomelídeos (*stricto sensu*), em que os adultos são conhecidos vulgarmente como “vaquinhas”, constituem um grupo com cerca de 35.000 espécies descritas (JOLIVET et al., 2009). As vaquinhas diferem dos cerambicídeos por serem menores, apresentarem antenas curtas e frequentemente filiformes e formato do corpo mais oval, além de uma cabeça encaixada parcial ou quase totalmente no protórax (LIMA, 1955; TRIPLEHORN & JOHNSON, 2011). As espécies são quase exclusivamente herbívoras e estão associadas a uma grande quantidade de plantas hospedeiras, principalmente dicotiledôneas (JOLIVET & PETITPIERRE, 1976), sendo que os adultos se alimentam basicamente de flores, folhas e partes tenras das plantas e as larvas apresentam hábitos variados, podendo se alimentar livremente nas folhas, serem minadoras, rizófagas, sitófagas ou broqueadoras de caules (TRIPLEHORN & JOHNSON, 2011). Devido a seus hábitos fitófagos muitas espécies são importantes pragas de culturas agrícolas e florestais em todo o mundo, já outras são importantes agentes de controle biológico de espécies de plantas nocivas.

A importância econômica dos crisomelídeos e a necessidade constante de desenvolver tecnologias alternativas ao uso de agrotóxicos que possam ser usadas no monitoramento e controle das populações nocivas à agricultura e à silvicultura, ou até mesmo no monitoramento das espécies usadas no controle biológico, têm estimulado, nas últimas décadas, estudos com a ecologia química desse grupo de insetos. Nesse sentido, até o momento, 85 espécies de Chrysomelidae já foram estudadas quanto à presença de semioquímicos. Em relação aos feromônios (sexual ou de agregação, de contato ou de

longa distância) estudos já foram realizados com cerca de 30 espécies. Em alguns casos tecnologias estão ou foram desenvolvidas (RAO et al., 2003; SOROKA et al., 2005; TÓTH et al., 2005; KUHAR et al., 2006; ZILKOWSKI et al., 2006).

Basicamente, o sistema de comunicação química intraespecífico em crisomelídeos, revelado por estudos recentes, é composto por feromônios de agregação produzidos pelos machos (BERAN et al., 2011), com exceção para as espécies do gênero *Diabrotica*, cujas fêmeas produzem um feromônio que atrai, a longas distâncias, apenas machos (SPENCER et al., 2009). Tais feromônios sexuais são relativamente simples em estrutura e constituídos por ésteres e cetonas alifáticas. Entretanto, os feromônios de agregação são mais diversos e apresentam estruturas relativamente simples, como em Criocerinae e em alguns Galerucinae, e misturas complexas, como em Alticinae. Há ainda relatos de feromônios de curta distância ou de contato, que permitem o reconhecimento de coespecíficos, nas subfamílias Chrysomelinae (DUBIS et al. 1987; SUGENO et al., 2006; GEISELHARDT et al., 2009b), Eumolpinae (PETERSON et al., 2007), Galerucinae (NARDI, 2010) e Hispinae (KAWAZU et al., 2011), sendo que os compostos são formados, na sua maioria, por hidrocarbonetos simples, mono ou dimetil alcanos.

O objetivo dessa revisão é prover uma visão geral sobre os feromônios de longa e curta distância produzidos por Chrysomelidae, e aqui não será levada em consideração os feromônios dentro da subfamília Bruchinae.

1.2. Feromônios de Chrysomelidae

1.2.1. Feromônios de longo alcance

Apenas uma quantidade muito pequena de feromônios de longo alcance produzido por machos (agregação) ou fêmeas (sexual) foi identificada em Chrysomelidae, quando comparados com a ordem Lepidoptera, por exemplo. Até o presente foram isolados e identificados compostos feromonais para 20 espécies distribuídas em nove gêneros e quatro subfamílias, sendo que a atratividade de alguns dos compostos também foi demonstrada para algumas espécies correlacionadas (**Tabela 1**) (EL-SAYED, 2013).

Tabela 1. Ocorrência de feromônios de longo alcance em Chrysomelidae.

Espécie	Subfamília	Tribo	Composto ¹	Tipo de Feromônio
<i>Aphthona cyparissiae</i>	Alticinae	Alticini	1a,1b,1c,1d,1e,1f	Ag. m
<i>Aphthona czwalinae</i>	Alticinae	Alticini	1a,1b,1c,1d,1e,1f	Ag. m
<i>Aphthona flava</i>	Alticinae	Alticini	1a,1b,1c,1d,1e,1f	Ag. m
<i>Aphthona nigricutis</i>	Alticinae	Alticini	Não identificado	Ag. m
<i>Epitrix fuscula</i>	Alticinae	Alticini	1i,1j	Ag. m
<i>Epitrix hirtipennis</i>	Alticinae	Alticini	1i, 1j, 1k	Ag. m
<i>Phyllotreta cruciferae</i>	Alticinae	Alticini	1a,1b,1c,1d,1e,1f	Sex. m
<i>Phyllotreta striolata</i>	Alticinae	Alticini	1a,1b,1d,1e,1g,1h	
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Chrysomelinae	Chrysomelini	1l	Ag. m
<i>Oulema melanopus</i>	Criocerinae	Lemini	1m	Ag. m
<i>Acalymma vittatum</i>	Galerucinae	Luperini	1n	Ag. m
<i>Aulacophora foveicollis</i>	Galerucinae	Luperini	Não identificado	Sex. f
<i>Diabrotica balteata</i>	Galerucinae	Luperini	1o	Sex. f
<i>Diabrotica barberi*</i>	Galerucinae	Luperini	1p	Sex. f
<i>Diabrotica cristata*</i>	Galerucinae	Luperini	1q	
<i>Diabrotica lemniscata*</i>	Galerucinae	Luperini	1p	Sex. f
<i>Diabrotica longicornis longicornis*</i>	Galerucinae	Luperini	1p	Sex. f
<i>Diabrotica porracea*</i>	Galerucinae	Luperini	1p	
<i>Diabrotica speciosa</i>	Galerucinae	Luperini	Não identificado	
<i>Diabrotica undecimpunctata duodecimnotata</i>	Galerucinae	Luperini	1r	Sex. f
<i>Diabrotica undecimpunctata howardi*</i>	Galerucinae	Luperini	1r	Sex. f
<i>Diabrotica undecimpunctata undecimpunctata*</i>	Galerucinae	Luperini	1r	Sex. f
<i>Diabrotica virgifera virgifera*</i>	Galerucinae	Luperini	1p	Sex. f
<i>Diabrotica virgifera zea*</i>	Galerucinae	Luperini	1p	Sex. f
<i>Galerucella calmariensis</i>	Galerucinae	Galerucini	1s	Ag. m
<i>Galerucella pusilla</i>	Galerucinae	Galerucini	1s	Ag. m
<i>Diorhabda elongata</i>	Galerucinae	Galerucini	1t, 1u	Ag. m

*A resposta difere de acordo com o tipo de isômero do composto. Ag. – feromônio de agregação; Sex. – feromônio sexual; m- macho; f – fêmea. ¹Veja a estrutura dos compostos na Figura 1.

1.2.1.1. Subfamília Alticinae

Phyllotreta Chevrolat

A primeira evidência da produção de um feromônio de agregação dentro dessa subfamília foi relatada por Peng & Weiss (1992) para *P. cruciferae* (Goeze). Esta espécie se alimenta de crucíferas, sendo uma importante praga em culturas de *Brassica* no Canadá e Índia (LAMB, 1989). Peng & Weiss (1992) demonstraram que crucíferas infestadas com adultos não sexados atraíram mais coespecíficos do que nos tratamentos com a planta

hospedeira sem besouros, danificadas e não danificadas, tanto em laboratório quanto no campo. Posteriormente, estudos de campo, com besouros vivos, apresentaram evidências de que o feromônio seria produzido pelos machos (PENG et al., 1999) e análises em cromatografia gasosa revelaram a liberação de seis sesquiterpenos (cinco hidrocarbonetos e uma cetona) candidatos a um feromônio de agregação macho-específico (BARTELT et al., 2001). Os compostos identificados através de métodos analíticos, como espectrometria de massa, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) foram **(5R,5 α S)-1,1,5,8-tetrametil-1,2,3,4,5,6,5 α -heptahidrobenzo[1,2- α][7]anuleno** (Fig. 1a); **(1R,7R)-2,2,10-trimetil-6-metileno-biciclo[5.4.0]undec-10-eno** (*trans*- α -himachaleno) (Fig. 1b); **(6R,7S)-2,2,6-Trimetil-10-metileno-biciclo[5.4.0]-undec-1(11)-eno** (Fig. 1c); **1-Isopropil-7-metil-4-metileno-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-naftaleno** (γ -cadineno) (Fig. 1d); **(R)-1,1,5,8-Tetrametil-1,2,3,4,5-pentahidrobenzo[α][7]anuleno** [(R)-*ar*-himachaleno] (Fig. 1e); **(1S,2R)-2,6,6-Trimetilbiciclo[5.4.0]undec-7-en-9-ona** (Fig. 1f).

Todos os seis compostos são quirais, e a estrutura básica, configuração absoluta e síntese dos enantiômeros 1a, 1c, 1e e 1f foram demonstradas por Bartelt et al. (2003), Muto et al. (2004) e Mori (2005). O composto 1d já era conhecido como constituinte do óleo de citronela (HEROUT & SÝKORA, 1958), mas os compostos 1a, 1b, 1c, 1e e 1f eram até então novos. Entretanto, os enantiômeros opostos dos compostos 1a e 1c, já tinham sido previamente isolados em árvores de *Abies nordmanniana* (Steven) Spach e *A. alba* Miller (BARTELT *et al.*, 2001; KHAN & PENTEGOVA, 1988; KHAN et al., 1989) e o enantiômero oposto do composto 1e em árvores de *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don. (PANDEY & DEV, 1968). Nem o composto 1b nem seus enantiômeros eram conhecidos na natureza, mas o antípoda tinha sido preparado, anteriormente, a partir de compostos derivados de plantas (JOSEPH & DEV, 1968). Já o composto 1f era totalmente desconhecido da ciência (BARTELT, 2010).

No campo, misturas racêmicas e enantiomericamente puras dos compostos 1a, 1c, 1e e 1f e do enantiômero natural do composto 1d, obtido de óleo de citronela, liberados juntos, aumentaram a captura de ambos os sexos de *P. cruciferae*, quando em associação com alil-isotiocianato, um produto da quebra de glicosinolatos da planta hospedeira *Brassica napus* L., tanto nos estudos conduzidos no Canadá (SOROKA et al., 2005) quanto na Hungria (TÓTH et al., 2005). Nos experimentos realizados por Tóth et al. (2005), outras sete espécies de *Phyllotreta* também foram capturadas, mas em baixa quantidade, quando a mistura feromonal em diferentes combinações mais o cairomônio da

planta hospedeira foram testados juntas. São elas: *P. vittula* (Redtenbacher), *P. nodicornis* (Masham), *P. procera* (Redtenbacher), *P. ochripes* (Curtis), *P. nigripes* (F.), *P. nemorum* (L.) e *P. undulata* (Kutschera). Os autores também verificaram que o composto 1a foi o único que apresentou uma atividade feromonal clara, e que a espécie *P. vittula* respondeu de forma similar a *P. cruciferae* em relação à mistura racêmicas e ao enantiômero puro desse composto, sugerindo que o composto testado possa ocorrer amplamente dentro desse gênero.

Segundo Beran et al. (2011), dos seis sesquiterpenos¹ emitidos por machos de *P. striolata* (Chevrolat), um herbívoro comum em Brassicaceae e famílias de plantas relacionadas, apenas o enantiômero (+)-(6*R*,7*S*)-**himachala-9,11-dieno** estimulou a antena de machos e fêmeas dessa espécie, e experimentos de campo e laboratório demonstraram que este é o composto principal do feromônio de agregação produzidos por machos dessa espécie e que a captura em armadilha aumenta sinergeticamente na presença de Alil isotiocianato. Outros compostos emitidos por *P. cruciferae* e identificados em *P. striolata* foram os compostos 1b, 1d e 1e, mas os machos de *P. striolata* também emitem os compostos (+)- **α -himachaleno** (Fig. 1g) e (+)- **β -himachaleno** (Fig. 1h).

Aphthona Chevrolat

Dentro desse gênero compostos candidatos a feromônio de agregação macho-específico foram detectados e identificados em *A. flava* Guillebeau, *A. czwalinae* (Weise), *A. cyparissiae* (Koch) (BARTELT et al., 2001) e há evidências da produção de um feromônio de agregação por machos de *A. nigriscutis* Foudras (TANSEY et al., 2005). Essas espécies são utilizadas como agentes de controle biológico de *Euphorbia esula* L. (Euphorbiaceae), uma espécie de herbácea perene e originária da Europa, que foi introduzida acidentalmente na América do Norte (GASSMANN et al., 1996). Compostos liberados por machos das três primeiras espécies foram coletados enquanto eles se alimentavam das suas plantas hospedeiras. Análises em cromatografia gasosa revelaram a presença de oito tipos de sesquiterpenos, produzidos em proporções espécie-específica, sendo que apenas seis apresentaram um resposta eletrofisiológica em machos e fêmeas de *A. flava* (BARTELT et al., 2001). Os seis sesquiterpenos liberados por machos das três espécies são os mesmos produzidos pelos machos de *P. cruciferae* (compostos 1a, 1b, 1c, 1d, 1e e 1f), mas em proporções diferentes. Os constituintes do feromônio de agregação em Alticinae podem ser atrativos entre as espécies, como observado por Tóth et al. (2005),

¹ Hidrocarbonetos de fórmula química C₁₅H₂₄, formados por três unidades isopreno, podendo ser cíclicos ou ramificados.

mas podem servir como pista de reconhecimento específico em uma situação de escolha natural (BERAN et al., 2011).

Utilizando um olfatômetro sem escolha, Tansey et al. (2005) encontraram evidências da produção de pistas químicas liberadas por machos que são atrativas para ambos os sexos de *A. nigricutis*, sendo que a densidade de insetos interfere na atratividade, apresentando um efeito repelente em alta densidade. Os compostos que mediam o comportamento de agregação dessa espécie ainda não foram identificados.

Epitrix Foudras

A primeira evidência da emissão de compostos macho-específicos dentro do gênero *Epitrix* foi demonstrada para a espécie *E. fuscula* Crotch (ZILKOWSKI et al., 2006), uma importante praga de berinjela no sul dos Estados Unidos (McLEOD et al., 2002). Análise de cromatografia gasosa de voláteis coletados de machos, fêmeas e de ambos, ao se alimentarem de folhas de berinjela, revelou a presença de seis compostos liberados apenas pelos machos (ZILKOWSKI et al., 2006). Os compostos majoritários foram identificados como sendo isômeros geométricos do aldeído **Nona-2,4,6-trienal**, pela primeira vez descrito como componente do feromônio em uma espécie de inseto e os quatro compostos minoritários foram identificados como sendo sesquiterpenos himachalenos comuns na subfamília Alticinae (compostos 1a, 1c e os álcoois (3*R*,9*R*,9*aS*) e (3*S*,9*R*,9*aS*) 2,3,5,6,7,8,9,9*a*-octahidro-3,5,5,9-tetrametil-1*H*-benzociclohepten-3-ol). Zilkowski et al. (2006) demonstraram que os isômeros (2*E*, 4*E*, 6*Z*)- (Fig. 1i) e (2*E*,4*E*,6*E*)- (Fig. 1j) são os compostos majoritários produzidos pelos machos de *E. fuscula*; eletrofisiologicamente mais ativos em dosagens inferiores a 1 ng/composto do que os demais compostos e, isômeros sintéticos dos aldeídos foram atrativos em teste de campo para ambos os sexos. Nos testes de campo realizados, o feromônio produzido por *E. fuscula* também atraiu a espécie relacionada *E. hirtipennis* (Melsheimer) sugerindo que machos dessa espécie possam liberar um feromônio relacionado àquele produzido por *E. fuscula*. Posteriormente, Zilkowski et al. (2008) constataram que machos de *E. hirtipennis*, ao se alimentarem de folhas de berinjela, liberaram seis isômeros do aldeído Nona-2,4,6-trienal, dois deles coincidem com os isômeros produzidos por *E. fuscula*. Entretanto, após análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa e HPLC, os autores concluíram que o componente majoritário do feromônio produzido por *E. hirtipennis* se refere ao isômero (2*E*,4*Z*,6*Z*)- (Fig. 1k), e que quantidades menores dos isômeros (2*Z*,4*E*,6*E*)-, (2*Z*,4*E*,6*Z*)-, (2*E*,4*Z*,6*E*)-, e (2*E*,4*E*,6*E*)-nona-2,4,6-trienal também foram

detectadas. Outra observação foi de que a exposição de qualquer um dos isômeros à luz prontamente gera uma mistura de seis isômeros geométricos do nona-2,4,6-trienal. Esta observação levanta a questão se os isômeros minoritários, presentes na mistura macho-específica das duas espécies não seriam produtos da degradação pela luz.

1.2.1.2. Subfamília Chrysomelinae

Leptinotarsa decemlineata (Say)

O Besouro-da-batata, *L. decemlineata*, é considerado a praga mais importante para a cultura de *Solanum tuberosum* L. (Solanaceae), nos Estados Unidos e Europa, sendo que tanto as larvas quanto os adultos se alimentam das folhas, comprometendo a produção do tubérculo (KUHAR et al., 2006). Os primeiros estudos com feromônios nessa espécie apontaram para a existência de um feromônio sexual de contato produzido pelas fêmeas (DEWILDE et al., 1969; LEVINSON et al., 1979; JERMY & BUTT, 1991). Posteriormente, Dickens et al. (2002) descobriram um composto liberado apenas por machos dessa espécie ao se alimentarem da planta hospedeira, que atrai ambos os sexos, fornecendo um novo modelo de comunicação química para o besouro-da-batata. O composto foi isolado e identificado como sendo **(S)-3,7-dimetil-2-oxo-6-octeno-1,3-diol** (terpenóide cetodiol) (Fig. 11), cuja síntese detalhada foi descrita por Oliver et al. (2002). Já Kuhar et al. (2006) demonstraram, no campo, que armadilhas iscadas com o feromônio de agregação sintético capturaram cinco vezes mais besouros do que armadilhas controle, apresentando pela primeira vez evidências para o uso potencial dessa tecnologia no manejo integrado de *L. decemlineata*.

1.2.1.3. Subfamília Criocerinae

Oulema melanopus L.

O besouro da folha do cereal, *O. melanopus*, é uma importante praga para a cultura de cereais, principalmente em culturas de trigo, aveia e cevada (WELLSO & HOXIE, 1988). Originário da Europa e Ásia (HAYNES & GAGES, 1981), o besouro foi acidentalmente introduzido na América do Norte e rapidamente aumentou sua abundância e distribuição (HELGESEN & HAYNES, 1972), afetando a indústria de cereais. Comparações de voláteis de machos e fêmeas de *O. melanopus* se alimentando de folhas de aveia, obtidas por Cossé et al. (2002) revelaram a presença de um composto macho-específico eletrofisiologicamente ativo. Após estudos de espectroscopia e microquímica os

autores confirmaram a cetona (***E***)-8-hidroxi-6-metil-6-octen-3-ona (Fig. 1m), como um possível feromônio de agregação produzido por machos de *O. melanopus*. A função feromonal da cetona foi confirmada através de estudos de campo realizadas por Rao et al. (2003), que demonstraram que armadilhas iscadas com o composto sintético atraíram machos e fêmeas na ordem de três vezes mais do que armadilhas controle.

1.2.1.4. Subfamília Galerucinae

Acalymma vittatum (F.)

O besouro listrado das curcubitáceas, *A. vittatum*, é um herbívoro especialista cujos adultos se agregam para se alimentarem de plantas jovens, sendo considerado uma importante praga na cultura do pepino, *Cucumis sativus* L. (MORRIS et al., 2005). Estudos de campo com armadilhas iscadas com insetos adultos e a planta hospedeira, realizados por Smyth & Hoffmann (2003), evidenciaram a presença de um feromônio de agregação produzido por machos. Posteriormente, Morris et al. (2005) isolaram de coleções de voláteis obtidos de machos que se alimentavam de *Curcubita pepo* L., uma nova β -lactona, determinada como (***3R,4R***)-3-metil-4-(1,3,5,7-tetrametiloctil)-oxetan-2-ona (vitalactona) (Fig. 1n). A atividade biológica do composto foi evidenciada pelos autores através de estudos eletrofisiológicos, que demonstraram que as antenas de machos e fêmeas são estimuladas na presença de vitalctona e através da não produção do feromônio pelas fêmeas. Estudos de campo, com o composto sintético, ainda não foram realizados, mas a síntese assimétrica total do composto e sua configuração absoluta foram demonstradas por Schmidt & Breit (2009).

Aulacophora foveicollis Lucas

Esta espécie é uma praga importante na cultura de curcubitáceas, sendo que tanto as larvas quanto os adultos são daninhos às mudas e plantas maduras (AL-ALI et al., 1982). Kumar & Nadarajan (2008), em seus estudos com insetos adultos e voláteis extraídos de ambos os sexos demonstraram, em condições de laboratório, a atratividade exclusivamente de machos aos possíveis voláteis liberados pelas fêmeas, evidenciando a presença de um feromônio sexual dentro dessa espécie. Entretanto, a caracterização desses voláteis ainda não foi demonstrada.

O gênero *Diabrotica* representa um amplo grupo de besouros fitófagos composto de 338 espécies válidas (WILCOX, 1972), sendo que 15 espécies e subespécies já foram registradas como importantes pragas em mais de 60 culturas diferentes (KRYSAN, 1986). O padrão de estrutura química dentro desse gênero parece estar relacionado à sua taxonomia (CHUMAN et al., 1987) e os estudos realizados até aqui com atraentes sexuais caem dentro de dois grupos principais, o grupo das espécies *virgifera* e o grupo das espécies *fucata*.

Grupo de espécies *fucata*. Esse grupo é composto por 305 espécies consideradas multivoltinas e com larvas polífugas (BRANSON & KRYSAN, 1981). A primeira evidência da existência de um atraente químico de longo alcance entre coespecíficos, dentro da família Chrysomelidae, foi demonstrada para a espécie *D. balteata* LeConte (CUTHBERT & REID, 1964), uma espécie polífoga cujas larvas atacam diversas culturas, particularmente a batata doce e a abóbora (ENDERS et al., 1995). Cuthbert & Reid (1964) mostraram que armadilhas no campo iscadas com fêmeas virgens de *D. balteata* ou extratos obtidos do abdômen delas foram capazes de atrair machos em distâncias superiores a 14 metros e por um período médio de 10 dias. Schwarz et al. (1971) foram os primeiros a tentarem elucidar a estrutura da molécula feromonal, mas suas análises foram incompletas até as descobertas de Chuman et al. (1987). Enquanto isso, outro táxon dentro desse grupo, *D. undecimpunctata*, composto por três subespécies *D. u. howardi* Barber, um inseto polífago e importante praga de amendoim, abóbora e milho (GUSS et al., 1983b); *D. u. undecimpunctata* Mannerheim e *D. u. duodecimnotata* Harold, começava a ter sua comunicação química elucidada. Branson et al. (1978), foram os primeiros a demonstrarem a atratividade sexual de machos de *D. u. duodecimnotata* por armadilhas iscadas com voláteis não fracionados obtidos de fêmeas de *D. u. duodecimnotata*, originárias do México e de *D. u. howardi*, originárias de Dakota do Sul (USA). Posteriormente, Guss et al. (1983b) isolaram e sintetizaram a partir de extratos obtidos de fêmeas de *D. u. howardi* a cetona **10-metiltridecan-2-ona** (fig. 1r) e verificaram que o enantiômero sintético *R* exerce maior atratividade nos machos do que o enantiômero *S*. Ainda segundo os autores, a mistura racêmica desse composto também atraiu machos das subespécies *D. u. undecimpunctata* e *D. u. duodecimnotata*, tendo sido demonstrado para a primeira uma forte preferência pelo enantiômero *R*. No final da década de 1980 os estudos com ecologia química de *D. balteata* foram retomados e Chuman et al. (1987) identificaram, isolaram e sintetizaram o composto **6,12-dimetilpentadecan-2-ona** obtido de extratos de fêmeas

virgens, e demonstraram que machos respondem igualmente aos extratos naturais e à mistura racêmica do composto sintético no campo. Em seguida, McLaughlin et al. (1991) estabeleceram a configuração absoluta do feromônio, indicando que a forma bioativa do atraente produzido pelas fêmeas de *D. balteata* era o isômero (*R, R*) (Fig. 1o), que não difere da resposta de machos pela mistura racêmica e que os demais estereoisômeros não atraem e nem parecem inibir a captura de machos no campo. Observa-se no grupo *fucata*, portanto, que a estrutura feromonal caracteriza-se pela presença de metil cetona e metil no carbono quatro da extremidade final da cadeia de hidrocarbonetos (CHUMAN et al., 1987). Ainda dentro desse grupo, evidências da produção de um feromônio produzido pelas fêmeas de *D. speciosa* (Germar) foram demonstrados por Ventura et al. (2001) e Nardi (2010), mas os compostos que mediam tal comportamento ainda não foram identificados. Estes são os únicos trabalhos com feromônios de crisomelídeos desenvolvidos no Brasil até o momento.

Grupo de espécies *virgifera* – Esse grupo compreende um complexo de 21 espécies intimamente relacionadas, univoltinas e com o hospedeiro larval restrito a algumas gramíneas (BRANSON & KRYSAN, 1981). Segundo Ball & Chaudhury (1973), a primeira indicação de um atraente sexual produzido por fêmeas dentro desse grupo foi fornecida na tese de M. D. Cates, de 1968, que demonstrou uma alteração no comportamento de machos de *D. virgifera virgifera* LeConte, quando em contato com papel filtro impregnado com possíveis odores de fêmeas virgens. Entretanto, como os resultados de Cates não foram estatisticamente conclusivos, Ball & Chaudhury (1973), usando extratos de fêmeas virgens (500 a 1000 fêmeas equivalentes), com histórico desconhecido, apresentaram resultados razoáveis sobre o efeito desses extratos na atração de machos em condições de campo e laboratório. Essas evidências, por sua vez, foram fortemente demonstradas, posteriormente, nos trabalhos de Guss (1976) e Bartelt & Chiang (1977), que também demonstram uma variação temporal entre as respostas de machos dessa espécie e de *D. longicornis* (= *D. barberi* Smith e Lawrence), uma espécie atualmente simpátrica de *D. v. virgifera*. Nos trabalhos de Krysan et al. (1980) foi demonstrado que armadilhas iscadas com extratos de fêmeas virgens de *D. v. virgifera* atraem machos de *D. v. zea* num padrão diário muito semelhante e que o inverso é verdadeiro. Os autores demonstraram ainda que armadilhas iscadas com extratos de fêmeas virgens de *D. v. zea* também atraem machos de *D. barberi*. Entretanto, foram Guss et al. (1982) os primeiros a isolarem e sintetizarem a mistura racêmica, **Propanoato de 8-metil-2-decila** (Fig. 1p), como constituinte do feromônio sexual de *D. v. virgifera*, o primeiro

composto feromonal a ser identificado dentro da família Chrysomelidae. A mistura racêmica desse composto, testada pelos autores no campo, também atraiu machos de outras espécies de *Diabrotica* como *D. barberi*, *D. l. longicornis*, *D. porracea* Harold e *D. v. zea*, sendo que para *D. barberi* a captura diminuiu com o aumento da concentração do feromônio e para *D. v. zea* os machos foram atraídos de maneira igual, em relação ao padrão de captura diária de machos de *D. v. virgifera*. Posteriormente, Guss et al. (1984) sintetizaram e testaram no campo a atratividade dos quatro possíveis estereoisômeros e demonstraram que *D. v. virgifera* e *D. v. zea* respondem fortemente ao isômero (2*R*,8*R*) e secundariamente ao isômero (2*S*,8*R*) enquanto que *D. porracea* responde exclusivamente ao isômero (2*S*, 8*R*). Em outro estudo com *D. barberi*, Guss et al. (1985) observaram que os machos dessa espécie são fortemente, se não exclusivamente, atraídos pelo isômero sintético (2*R*, 8*R*) e severamente inibidos na presença de baixos níveis do isômero (2*S*, 8*R*). Krysan et al. (1986), procurando estabelecer uma relação sistemática dentro do grupo das espécies *virgifera* em relação à atratividade ao composto **propanoato de 8-metil-2-decila**, demonstraram em seus estudos que machos de *D. longicornis* são fortemente atraídos pelo isômero (2*S*, 8*R*) e que esta resposta diminui na presença de quantidades iguais do isômero (2*R*, 8*R*), e que armadilhas iscadas com extratos de fêmeas virgens de *D. v. virgifera* atraem apenas machos dessa espécie e aquelas iscadas com extratos de fêmeas virgens de *D. longicornis* atraem os machos de ambas as espécies. Além disso, os autores demonstraram que machos de *D. lemniscata* LeConte podem responder tanto ao isômero (2*S*, 8*R*) quanto ao isômero (2*R*, 8*R*). Assim, todas as diabróticas do grupo *virgifera*, pelo menos aquelas ocorrentes nos Estados Unidos, respondem à mistura racêmica do propanoato de 8 -metil-2-decila, com exceção dos machos de *D. cristata* (Harris) que, segundo Guss et al. (1983a), respondem à mistura de **Acetato de 8-metil-2-decila** (Fig. 1q) e ao seu isômero (2*S*, 8*R*). Portanto, Guss et al. (1984) acreditam que 8-metil-2-decanol represente um precursor biossintético comum dentro desse grupo e, segundo Krysan et al. (1986), as respostas diferenciais aos isômeros e análogos do propanoato de 8-metil-2-decila aparentemente exercem papel fundamental nas interações sexuais e isolamento reprodutiva desse grupo.

Na América do Norte e Europa, os estudos realizados com ecologia química de algumas espécies de diabróticas têm permitido a integração do uso de armadilhas de feromônios no manejo integrado dessas espécies (TOLLEFSON, 1998; CHANDLER, 2003; BORIANI et al., 2006; SPENCER et al., 2009). Aliado a essa tecnologia, estão os estudos com a caracterização dos voláteis de plantas responsáveis pela atração ou

repelência de adultos (METCALF, 1987; HAMMACK et al., 1999; HAMMACK, 2001), o que tem gerado importantes perspectivas com relação à manipulação das espécies economicamente importantes de diabroticas no campo.

Galerucella Crotch

Dentro desse gênero a atração química entre coespecíficos foi demonstrada para duas espécies, *Galerucella californiensis* (L.) e *G. pusilla* (Duftschmidt) que, segundo Hight et al. (1995), foram introduzidas nos Estados Unidos como agentes de controle biológico da espécie invasora *Lythrum salicaria* (L.) (Lythraceae). Assim, com o objetivo de desenvolver ferramentas para o monitoramento das populações desses agentes de controle biológico, Bartelt et al. (2006) demonstraram que machos das duas espécies, ao se alimentarem da planta hospedeira, emitem um feromônio de agregação que é eletrofisiologicamente ativo tanto em machos quanto em fêmeas, para as duas espécies. Os autores então isolaram, identificaram e sintetizaram o composto como sendo a lactona, **12,13-dimetil-5,14-dioxabicyclo[9.2.1]-tetradeca-1(13),11-dien-4-ona** (dimetilfurano-lactona) (Fig. 1s), e testes de campo com o composto sintético atraíram ambos os sexos das duas espécies. Novas evidências sobre a produção e função do feromônio produzido pelos machos de *G. californiensis* foram também demonstradas por Bartelt et al. (2008). Este é o primeiro feromônio de inseto que inclui o furano em sua estrutura, demonstrando a diversidade química de feromônios encontrados dentro da família Chrysomelidae.

Diorhabda elongata Brullé

A espécie *D. elongata* é um agente de controle biológico de *Tamarix* spp. (Tamaricaceae), uma árvore exótica invasora que causa diversos problemas aos ecossistemas dos Estados Unidos (ZAVALETA, 2000). Os besouros adultos entram em diapausa no inverno e emergem da serra-pilheira na primavera, podendo ocorrer até duas gerações por ano (DELOACH et al., 2004). Com o objetivo de desenvolver um sistema de monitoramento baseado em feromônios capazes de gerar informações sobre certos atributos populacionais desses crisomelídeos, Cossé et al. (2005) demonstram que machos de *D. elongata*, ao se alimentarem da planta hospedeira, liberam pelo menos dois compostos que são eletrofisiologicamente ativos para ambos os sexos, os quais foram determinados como sendo o álcool, **(2E, 4Z)-hepta-2,4-dien-1-ol** (Fig. 1t), e o aldeído, **(2E, 4Z)-hepta-2,4-dienal** (Fig. 1u). Nos testes de campo, realizados pelos autores, a atratividade de ambos os sexos foi significativamente igual em armadilhas iscadas apenas

com o álcool e com a mistura dos dois compostos, mas significativamente maior quando os dois tratamentos foram comparados com armadilhas iscadas apenas com o aldeído. Este feromônio de agregação é uma mistura de compostos pequenos no tamanho e simples na estrutura, quando comparado com outros feromônios de agregação e, segundo Cossé et al. (2005), apresenta grande similaridade com os chamados “voláteis de folhas verdes”.

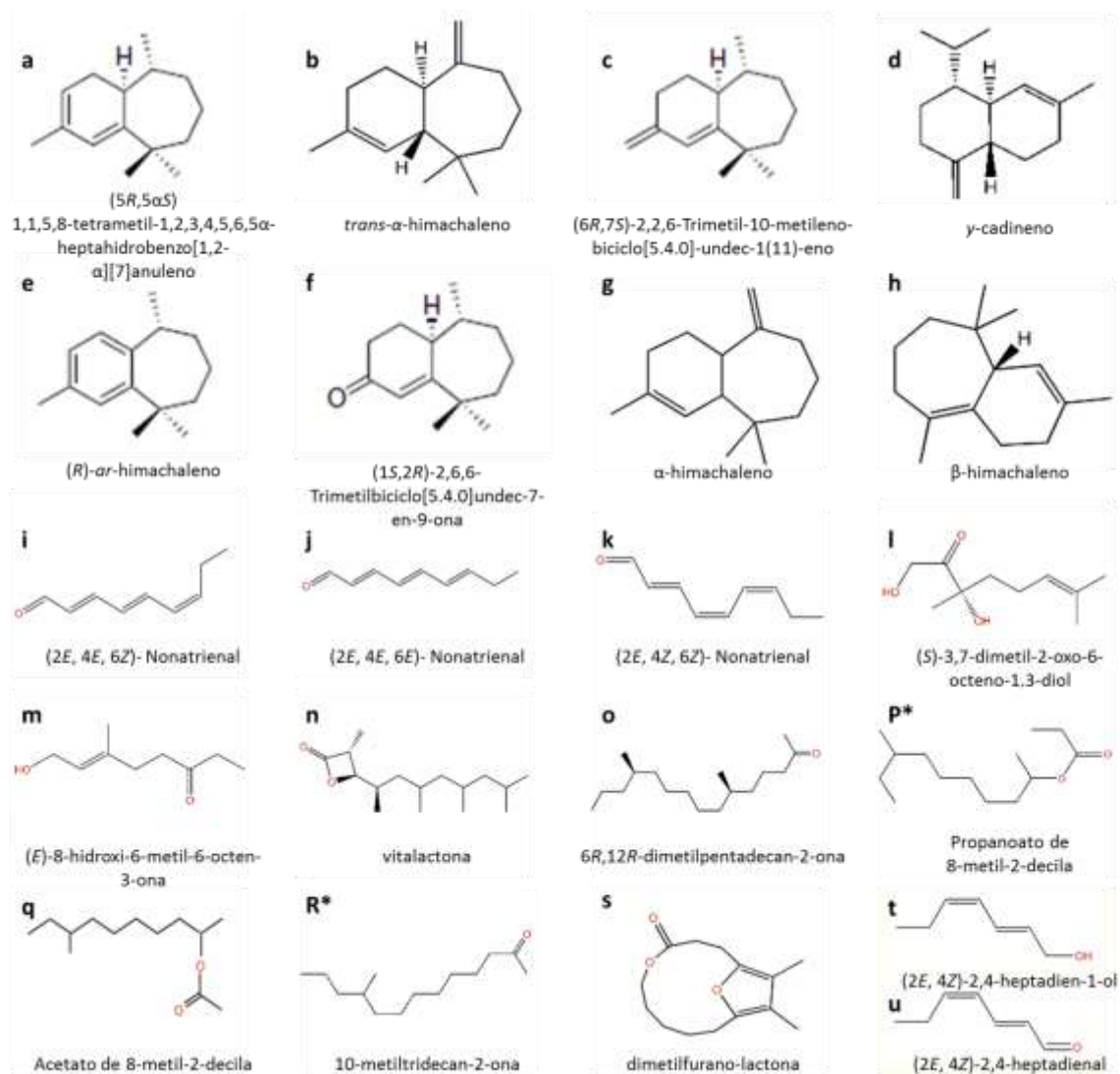


Figura 1. Estrutura dos compostos encontrados nos feromônios de longo alcance de Chrysomelidae. Fonte: El-Sayed (2013). * O composto apresenta diferentes isômeros que desencadeiam diferentes respostas em diferentes espécies e/ou subespécies.

1.2.2. Feromônios de contato

Hidrocarbonetos cuticulares representam um papel importante na comunicação química de insetos (SUGENO et al., 2006), pois podem mediar o comportamento sexual (Coleoptera, Diptera e Lepidopteras), facilitar o reconhecimento dos companheiros de ninho (Hymenoptera e Isoptera) e o reconhecimento de hospedeiros (Hymenoptera) (BLOMQUIST et al., 1996). Esses hidrocarbonetos de contato podem também

desempenhar um papel importante no isolamento sexual de espécies intimamente relacionadas e compreender a variabilidade evolucionária desses sistemas de sinalização, e podem aumentar a eficiência dos projetos com manejo de pragas que são baseados em sinais sexuais (PETERSON et al., 2007).

A presença de hidrocarbonetos cuticulares em Chrysomelidae já foi investigada em algumas espécies (GOLDEN et al., 1992; NIKOLOVA et al., 1999; NELSON et al., 2002; 2003; NELSON & CHARLET, 2003; GEISELHARDT et al., 2009a). Entretanto, evidências de hidrocarbonetos cuticulares atuando no comportamento sexual foram demonstradas apenas para as espécies *Leptinotarsa decemlineata* (LEVINSON et al., 1979; JERMY & BUTT, 1991), *Chrysochus cobaltinus* LeConte, *C. auratus* (F.) (PETERSON et al., 2007), *Phaedon cochleariae* (F.) (GEISELHARDT et al., 2009b) e *Diabrotica speciosa* (NARDI, 2010), sendo que apenas em *Gastrophysa atrocyanea* Motschulsky (SUGENO et al., 2006) os compostos envolvidos no comportamento de acasalamento foram caracterizados.

1.2.2.1. Subfamília Chrysomelinae

Gastrophysa atrocyanea Motschulsky

Em coleópteros, certos comportamentos de corte e acasalamento realizados por machos de várias espécies de cerambicídeos, por exemplo, são desencadeados por hidrocarbonetos cuticulares produzidos pelas fêmeas e que servem como um feromônio sexual de contato (FUKAYA et al., 1996, GINZEL et al., 2003; ZHANG et al., 2003). Semelhanças no comportamento de machos de *G. atrocyanea* durante o acasalamento com aquele de cerambicídeos levaram Sugeno et al. (2006) a suspeitarem da produção de um feromônio sexual de contato pelas fêmeas dessa espécie. Esse inseto constrói dois esconderijos no solo durante sua vida, um no estágio pré-pupal e outro antes de entrar em diapausa, e depois de se alimentar por uma a duas semanas como adulto (TANAKA & SUZUKI, 2005). Assim, usando fêmeas em pós-diapausa, Sugeno et al. (2006) revelaram a produção, nos élitros, de uma série de monometil alcanos, sendo que **9-metilheptacosano** (Fig. 2a), **11-metilheptacosano** (Fig. 2b), **9-metilnonacosano** (Fig. 2c) e **11-metilnonacosano** (Fig. 2d) foram considerados os componentes do feromônio de contato desse besouro devido à alta atividade comportamental observadas pelos machos em contato experimental com esses compostos. Os autores observaram, ainda, que a atividade feromonal é influenciada pelo comprimento da cadeia de carbono e pela posição da ramificação metil. Este é o primeiro trabalho com feromônios de contato em

Chrysomelidae que demonstra a bioatividade de hidrocarbonetos associados ao comportamento sexual.

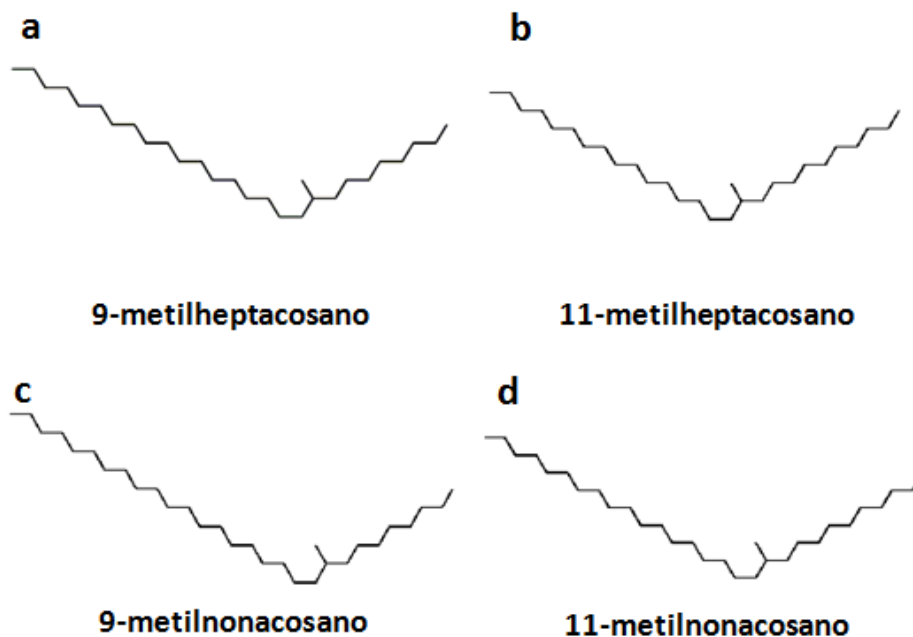


Figura 2. Estrutura dos compostos bioativos do feromônio sexual de contato produzido nos élitros de fêmeas de *Gastrophysa atrocyanea*.

Leptinotarsa decemlineata

DeWilde et al. (1969) ao estudarem, em túnel de vento, a orientação olfativa de besouros adultos de *L. decemlineata* em direção a odores obtidos de plantas, observaram que a resposta anemotática dos machos aumentava quando fêmeas eram colocadas juntas com as plantas, o que levou os autores a desconfiarem da produção de um odor por parte das fêmeas que era atrativo para os machos. Entretanto, foram Levinson et al. (1979) os primeiros a apresentarem resultados consistentes sobre a percepção olfativa dos machos em relação aos odores produzidos pelas fêmeas e a demonstrarem a importância de tais odores no reconhecimento de parceiros. Para os autores, as fêmeas maduras produzem, nos élitros, um feromônio sexual de contato que elícita, a curta distância, o comportamento de cópula dos machos. No entanto, a sequência completa do comportamento copulatório dos machos depende tanto de estímulos químicos quanto de estímulos táteis (LEVINSON et al., 1979; JERMY & BUTT, 1991). Até o presente momento as estruturas químicas dos compostos cuticulares que atuam no comportamento sexual dessa espécie ainda são desconhecidas, mas, de acordo com Dubis et al. (1987), os hidrocarbonetos cuticulares de adultos, machos e fêmeas, de *L. decemlineata* são formados basicamente por uma mistura

complexa de compostos saturados de 2-metilalcanos, e ramificações de mono, di, tri e provavelmente tetrametil alcanos, sendo que a composição quantitativa é sexo-dependente e variável com a idade. Como no trabalho de Levinson et al. (1979) os extratos usados foram obtidos em pentano (fração não polar), Dubis et al. (1987) sugerem que alcanos de cadeia longa e com ramificações metil presentes na cutícula das fêmeas possam ser os responsáveis pela estimulação e atração a curta distância dos machos. Ainda segundo Dubis et al. (1987), as diferenças observadas por eles no perfil de hidrocarbonetos de ambos os sexos também sejam usadas pelos adultos de *L. decemlineata* no reconhecimento sexual.

Phaedon cochleariae (F.)

O crisomelídeo, *P. cochleariae*, é uma espécie oligófaga que se alimenta de uma grande variedade de espécies de crucíferas (Balachowsky, 1963). Estudos realizados por Geiselhardt et al. (2009b) demonstraram a presença de 67 compostos na cutícula tanto de machos quanto de fêmeas, sendo que o perfil de hidrocarbonetos é sexo-específico em relação às quantidades relativas dos compostos e representados por hidrocarbonetos de cadeia aberta não ramificados, metil-ramificados e insaturados com até 45 carbonos. Segundo os autores, machos não foram capazes de fazer discriminações entre machos e fêmeas, vivos, mortos e extratos crus dos dois sexos, mas entre as frações polar e apolar dos extratos usados, o único que desencadeou o comportamento de acasalamento dos machos foi a fração polar (hidrocarbonetos saturados) em comparação com extratos crus. Os hidrocarbonetos saturados, em *P. cochleariae*, são representados na grande maioria por 2-metil alcanos, e em seguida por monometil alcanos, dimetil alcanos e em menor proporção por n-alcanos. A alta porcentagem de compostos de 2-metil alcanos parece ser comum entre os crisomelídeos, pelo menos para as espécies já investigadas (DUBIS et al., 1987; NIKOLOVA et al., 1999; NELSON et al., 2002; 2003; NELSON & CHARLET, 2003; PETERSON et al. 2007; GEISELHARDT et al., 2009a).

1.2.2.2. Subfamília Eumolpinae

Chrysochus

Dentro da subfamília Eumolpinae, o único estudo com hidrocarbonetos de contato foi realizado com o objetivo de estabelecer as funções da sinalização química na escolha de parceiros e isolamento sexual entre as espécies de besouros-desfolhadores, *Chrysochus cobaltinus* LeConte e *C. auratus* (F.) (PETERSON et al., 2007). As duas espécies se

alimentam de plantas do gênero *Asclepias* (Asclepiadaceae) e *Apocynum* (Apocynaceae) (DOBLER et al., 1998), e em relação ao comportamento sexual são altamente promíscuas (PETERSON et al., 2007) e conhecidas por formarem uma zona de simpátria no Estado de Washington (EUA), onde acasalamentos cruzados acontecem livremente entre as duas espécies (Peterson et al., 2001). Analisando esse sistema, Peterson et al. (2007) identificaram 27 hidrocarbonetos de contato presentes na cutícula dos besouros, sendo que apenas três não foram encontrados em ambos os sexos das duas espécies. Os compostos eram formados por simples hidrocarbonetos, sendo 12 *n*-alcanos, com 22 a 34 carbonos, quatro alcenos não ramificados, 10 monometil alcanos e um dimetil alcano. Os autores demonstram que a preferência de machos de *C. cobaltinus* por fêmeas coespecíficas é mediada por químicos cuticulares sexo e espécie-específico e, mesmo sem demonstrarem quais compostos ou qual a razão entre os químicos são responsáveis por essa preferência, eles acreditam que os hidrocarbonetos de contato são os sinais mais prováveis que orientam durante a escolha de parceiro nas duas espécies.

1.2.2.3. Subfamília Galerucinae

Diabrotica speciosa (Germar, 1824)

A “Vaquinha”, ou “Brasileirinho”, *D. speciosa* é uma praga polífoga de grande importância econômica para a América Latina por ser muito frequente em diversas culturas (VENTURA et al., 2001). O adulto alimenta-se da parte aérea de plantas, enquanto a larva, de raízes e tubérculos (GASSEN, 1989). Nardi (2010) demonstrou que compostos cuticulares presentes nos élitros de fêmeas dessa espécie atuam no comportamento sexual dos machos, sendo que das frações dos compostos obtidas em acetona, clorofórmio, diclorometano e hexano, os machos responderam significativamente mais aos extratos obtidos em acetona. O autor demonstrou também que os machos respondem de forma diferencial aos extratos de fêmeas com diferentes idades, sugerindo que a maturação sexual possa estar influenciando a produção dos compostos responsáveis pela estimulação do comportamento sexual. O isolamento dos compostos e a identificação das estruturas químicas ainda não foram demonstrados para *D. speciosa*, mas este é o primeiro trabalho com compostos cuticulares desenvolvidos com uma espécie de crisomelídeo, no Brasil.

1.2.2.4. Subfamília Hispinae

Brontispa longissima (Gestro, 1885)

Brontispa longissima é uma importante praga de coqueiro (*Cocus nucifera* L.), mas pode atacar também diversas palmáceas ornamentais (CHIN & BROWN, 2001). Nativa da Indonésia e Papua Nova Guiné, esta espécie foi introduzida em vários países da Ásia (LU et al., 2008) e da Oceania (CHIN & BROWN, 2001). Tanto as larvas quanto os adultos infestam, preferencialmente, os folíolos das folhas ainda fechadas de palmáceas para se alimentarem dos tecidos parenquimáticos (BROWN & GREEN, 1958). A presença de um feromônio sexual de contato, presente na cutícula de fêmeas adultas de *B. longissima* o qual é percebido pelo contato direto dos machos, foi demonstrado por Kawazu et al. (2011). Segundo os autores, apenas a fração apolar dos extratos obtidos em hexano desencadearam uma resposta comportamental em machos semelhante a dos extratos crus, indicando que um ou mais compostos de hidrocarbonetos apolares funcionem como um feromônio sexual de contato em *B. longissima*.

Capítulo 2

Constituintes químicos presentes em voláteis de adultos de *Costalimaita ferruginea* (Coleoptera: Chrysomelidae) e de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis*

2.1. Introdução

O eucalipto é a essência florestal mais importante e amplamente cultivada ao redor do mundo (GIAMAKIS et al., 2001), com destaque para as espécies *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake e *E. grandis* Hill ex. Maiden (FAO, 2005). No Brasil, clones de híbridos entre as duas espécies são amplamente utilizados para a formação de plantios comerciais (ARAUJO et al., 2010) por apresentarem características desejáveis para o setor florestal. Entretanto, como qualquer outra espécie vegetal cultivada, os plantios de eucalipto são frequentemente alvos de insetos-praga. O besouro-amarelo, *Costalimaita ferruginea* (Fabricius, 1801) (Chrysomelidae: Eulmopinae) é um importante besouro desfolhador de eucalipto, no Brasil (ANJOS & MAJER, 2003). Os adultos, que emergem logo após as primeiras chuvas, quando em surtos populacionais, são facilmente observados em agregações se alimentando das folhas, brotações novas e tecidos tenros das árvores de eucalipto (ANJOS, 1992). Os danos causados a essa essência florestal têm reflexos diretos no crescimento das árvores com consequente perda na produção de madeira (MENDES, 2004).

Na natureza são bem conhecidos diversos modelos de relações entre inseto-inseto, inseto-planta e inseto-planta-inseto, que na grande maioria das vezes, são mediadas por compostos voláteis. Dentro da família Chrysomelidae, há alguns exemplos de compostos voláteis liberados pelos besouros e que são utilizados como pistas para a localização de indivíduos do sexo oposto para acasalamento (CUTHBERT & REID, 1964; BRANSON et al. 1978; GUSS et al., 1983b; CHUMAN et al., 1987, NARDI, 2010) ou para a localização e reconhecimentos de indivíduos da mesma espécie visando a alimentação ou acasalamento (DEWILDE et al., 1969; PENG & WEISS 1992; BARTELT et al., 2001; ZILKOWSKI et al., 2006; LEVINSON et al., 1979; JERMY & BUTT, 1991). Entretanto, em termos de relações inseto-inseto, dentro da subfamília Eumolpinae estudos foram

realizados apenas com feromônios de contato, utilizados para sinalizar a presença de parceiros potenciais e na isolamento sexual interespecífica (PETERSON et al., 2007).

As plantas, por sua vez, liberam uma mistura de compostos voláteis que são produzidos em diferentes rotas biosintéticas (PICHERKY & GERSHENZON, 2002). Esses voláteis contêm informações que podem ser usadas por herbívoros para encontrar seus hospedeiros, selecionar locais para oviposição e parceiros potenciais e evitar outros indivíduos e a competição por alimento. Não diferente de outras famílias da Ordem Coleoptera, as pistas olfatórias representam uma importante função na localização de hospedeiros por adultos em Chrysomelidae (FERNANDEZ & HILKER, 2007).

Os terpenos são a classe mais abundante de voláteis emitidos pelo gênero *Eucalyptus* (NUNES & PIO, 2001). Esta classe é formada por compostos com múltiplos de cinco carbonos, classificando-os em hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e assim por diante (KESSELMEIR & STAUDT, 1999). O monoterpeno oxigenado, **1,8-Cineol** (Eucaliptol), é o composto mais abundante extraído do eucalipto, mas a sua concentração pode variar de uma espécie para outra. Outros monoterpenos hidrocarbonetos, também são emitidos em quantidades relativamente altas (**α -Pineno**; **Limoneno**, ***p*-Ocimeno**, **β -Pineno**, **α -Felandreno**, **Camfeno**, **γ -Terpineno**), enquanto que outros sesquiterpenos hidrocarbonetos e monoterpenos oxigenados podem ser liberados em quantidades menores (NICOLE et al., 1998; PAGULA et al., 2000). Por exemplo, Araújo et al. (2010), demonstraram uma alta frequência do composto ***o*-Cimeno** na constituição do óleo extraído das folhas de híbridos de *E. urophylla* vs. *E. grandis*, seguida pelo **Eucaliptol**.

Alterações na taxa de emissão de alguns compostos do eucalipto durante a herbivoria já foram documentados na literatura (ZINI et al., 2001) e a sensibilidade de neurônios sensoriais olfatórios a diversos compostos do eucalipto já foram demonstrados, por exemplo, para *Ctenarytaina eucalypti* (Maskell) (Hemiptera: Psyllidae) (YUVARAJ et al.; 2013). Entretanto, esta relação inseto-planta, ainda não foi analisada em nível químico e comportamental para o sistema *C. ferruginea* e sua planta hospedeira (eucalipto). Assim, este trabalho tem como objetivo caracterizar os voláteis liberados por *C. ferruginea* e pelo eucalipto e investigar as diferenças qualitativas e quantitativas nos voláteis liberados durante e após a herbivoria. Para isso, os voláteis foram coletados em *headspace* e analisados em cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massa (CG-EM).

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Insetos

Adultos de *C. ferruginea*, de idade e *status* reprodutivos (acasalados ou virgens) desconhecidos, foram coletados em um plantio de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake, plantado no espaçamento 3,0 X 3,0 m, com cerca de 30 meses de idade, localizado no município de Coimbra, em Minas Gerais, Brasil (20°49'54,87"S e 42°51'58,28" O). Os besouros adultos foram coletados, manualmente, de novembro a dezembro de 2012, e todos os insetos capturados foram levados para o laboratório de Manejo de Pragas Florestais da Universidade Federal de Viçosa. Os insetos foram separados por sexo, de acordo com observações de Anjos (1992), colocados em potes de vidro (2L) contendo ramos de eucalipto para alimentação e acondicionados em câmara climática (25°C, ± 70% de Umidade Relativa (UR) e fotoperíodo de 12 horas) até sua utilização nas coletas de voláteis e nos testes com detector eletroantenoográfico.

2.2.2. Espécie vegetal hospedeira

Os ramos de eucalipto utilizados na alimentação dos adultos de *C. ferruginea* e nas coletas de voláteis foram obtidos de clones híbridos de *E. urophylla* vs. *E. grandis* cedidas pela Suzano Papel e Celulose. As mudas foram transplantadas para garrafas do tipo *pet* utilizando-se terra como substrato e mantidas no pátio do Laboratório de Manejo de Pragas Florestais da Universidade Federal de Viçosa (20°45'29,97"S e 42°52'7,24"O) até a sua utilização. As árvores utilizadas tinham cerca de seis meses de idade e utilizaram-se, preferencialmente, ramos apicais com folhas novas (cerca de 30 cm de comprimento).

2.2.3. Coleta dos voláteis

Amostras de voláteis foram coletados em *headspace* utilizando um sistema fechado operado por uma bomba de vácuo (KNF Neuberger Laboport) que gerou um fluxo de ar (200 ml/min) contínuo dentro do sistema coletor. A câmara de aeração dos voláteis foi constituída pela conexão de dois frascos de vidro, ligada ao sistema de ar a vácuo através de conectores e tubos de silicone. Em uma das extremidades foi adicionado um filtro de polímero Porapak Q contendo 20 mg do polímero para retenção de voláteis, e na outra extremidade conectou-se um fluxo de ar umidificado e purificado por filtro de carvão ativado. A coleta de voláteis foi realizada por um período de 24 horas, com fotoperíodo de 12 horas. Após o período de coleta de voláteis, os filtros de Porapak foram lavados com 300 µL de hexano (Sigma Aldrich, EUA) para a dessorção dos compostos, e as amostras

obtidas foram concentradas a 70 µL. Posteriormente, foi adicionado a cada amostra concentrada 30 µL de **Acetato de heptila** como padrão interno, na concentração de 30 ng µL⁻¹. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro (2 ml) e colocadas no congelador a -19° C, até sua utilização nas análise em cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).

Para a determinação dos compostos específicos de cada sexo e de cada sexo em associação com o eucalipto, grupos separados de 20 machos e 20 fêmeas foram colocados na câmara de aeração com ou sem a presença de ramos de eucalipto. Quando os insetos foram colocados em associação com o eucalipto, foram usadas câmaras de aeração verticais. Neste caso, para a fixação e manutenção da turgidez dos ramos de eucalipto (cerca de 30 cm de comprimento). Estes foram inseridos dentro da câmara de aeração em potes de vidro (20 ml) contendo água destilada e vedados na sua abertura superior, por tiras de papel alumínio. Todo o sistema era trocado a cada 24 horas. Foram aerados ainda, por 24 horas, apenas ramos de eucalipto e ramos de eucalipto danificados após a alimentação dos besouros. Nesse último caso, 20 insetos (de sexo desconhecido) foram colocados em potes de vidro (5 L) contendo o ramo de eucalipto com sua haste inserida dentro de frascos de vidro (20 ml) contendo água destilada para manter a turgidez das folhas. Para impedir a entrada dos insetos dentro do frasco, este foi tampado na extremidade superior com algodão e vedado com Parafilm® e, para impedir a fuga e permitir a circulação de ar, a abertura superior do pote grande foi fechada com tecido *voal*. O sistema foi mantido em câmara climática (temperatura de 25 ± 0,5 °C, UR de 70 ± 10% e fotoperíodo de 12 horas) por um período de 24 horas. Após esse período os insetos foram retirados com o auxílio de pinça e o ramo danificado foi utilizado na coleta dos voláteis. Os ramos foram adicionados na câmara de aeração com suas hastes inseridas dentro de potes de vidro, conforme descrito anteriormente. Foram produzidas cinco amostras para cada uma das seguintes coleções de voláteis (tratamentos): machos sozinhos (M); fêmeas sozinhas (F); machos se alimentando de ramos do eucalipto (M+E); fêmeas se alimentando de ramos do eucalipto (F+E); ramos de eucalipto após a alimentação pelos besouros (EA) e; ramos de eucalipto sem ataque e sem insetos (ES).

2.2.4. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

As amostras foram analisadas em GC-EM (Shimadzu, modelo QP2010) (Figura 3) com injeção manual de 1 µL. O CG-EM era equipado com uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm – Rextex RTX -5) e foi operado no modo de injeção *splitless*. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste em um fluxo de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura do

injetor foi de 250 °C. O programa de aquecimento do forno da coluna foi programado para aquecer 35 °C por 5 min e depois 8 °C min⁻¹ até 280 °C totalizando 40,63 min (tempo de análise). Para a detecção dos íons foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 70 eV.



Figura 3. Cromatógrafo em fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massa (GC-EM - Shimadzu, modelo QP2010). Viçosa/MG, 2012.

2.2.5. Identificação dos compostos

A identificação dos compostos foi realizada com base na comparação de seus Índices de Kovats (KI), tempo de retenção e espectro de massa com aqueles obtidos nas bibliotecas do *software* GCMSolution versão 2.7 e na literatura (ADAMS, 2007; EL-SAYED, 2013). Os KI's foram determinados em relação ao tempo de retenção (TR) utilizando-se uma solução estoque de uma mistura de hidrocarbonetos (C7-C30) obtidos em condições analíticas idênticas àsquelas usadas nas análises de CG-EM.

2.3. Resultados

As análises em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa revelaram um total de 83 compostos presentes nos voláteis obtidos de adultos de *C. ferruginea* sozinhos, em associação com os ramos de eucalipto e de ramos após o ataque e sem ataque. A identificação dos compostos, com base nas bibliotecas NIST08 e WILEY7 e em comparação com espectros de massas disponíveis na literatura (ADAMS, 2007) e em

bancos de dados da web [The pherobase (EL-SAYED, 2013) e NIST – National Institute of Standards and Technology] foi possível para 91,57% de todos os compostos detectados. Destes, 23,4% foram classificados como sesquiterpenos hidrocarbonetos, 16,9% como monoterpenos hidrocarbonetos, 13,0% como monoterpenos oxigenados, 2,6% como sesquiterpenos oxigenados e o restante representado por hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, ésteres e cetonas, conhecidos como voláteis de folhas verdes (VFV's).

Nos perfis cromatográficos de ramos de eucalipto sem o ataque de *C. ferruginea* (tratamento ES), um total de 44 picos foi detectado (Figura 4A) considerando os cromatogramas gerados para as cinco amostras desse tratamento. Desse total, apenas para um dos picos o composto correspondente não foi identificado. Quando os voláteis foram coletados de fêmeas adultas de *C. ferruginea* se alimentando dos ramos de eucalipto (tratamento F+E) foi possível detectar um total de 72 picos (Figura 4B) e, destes, três não foram identificados. Perfil semelhante foi observado quando os voláteis foram coletados de machos adultos se alimentando do eucalipto (tratamento M+E), o que gerou um total de 66 picos (Figura 5A), sendo que para quatro não foi possível realizar a identificação do composto correspondente. Já nos voláteis coletados após a herbivoria dos besouros (tratamento EA), observou-se que os ramos de eucalipto atacados e sem insetos liberaram um total de 63 compostos (Figura 5B) e, destes, 60 foram identificados. Já os voláteis de fêmeas (tratamento F) e machos (tratamento M) adultos liberados na ausência da planta hospedeira produziram um total de 30 e 32 picos, respectivamente (Figura 6). Para as fêmeas apenas um pico não foi possível realizar a identificação e para os machos a identificação não foi possível para quatro picos.

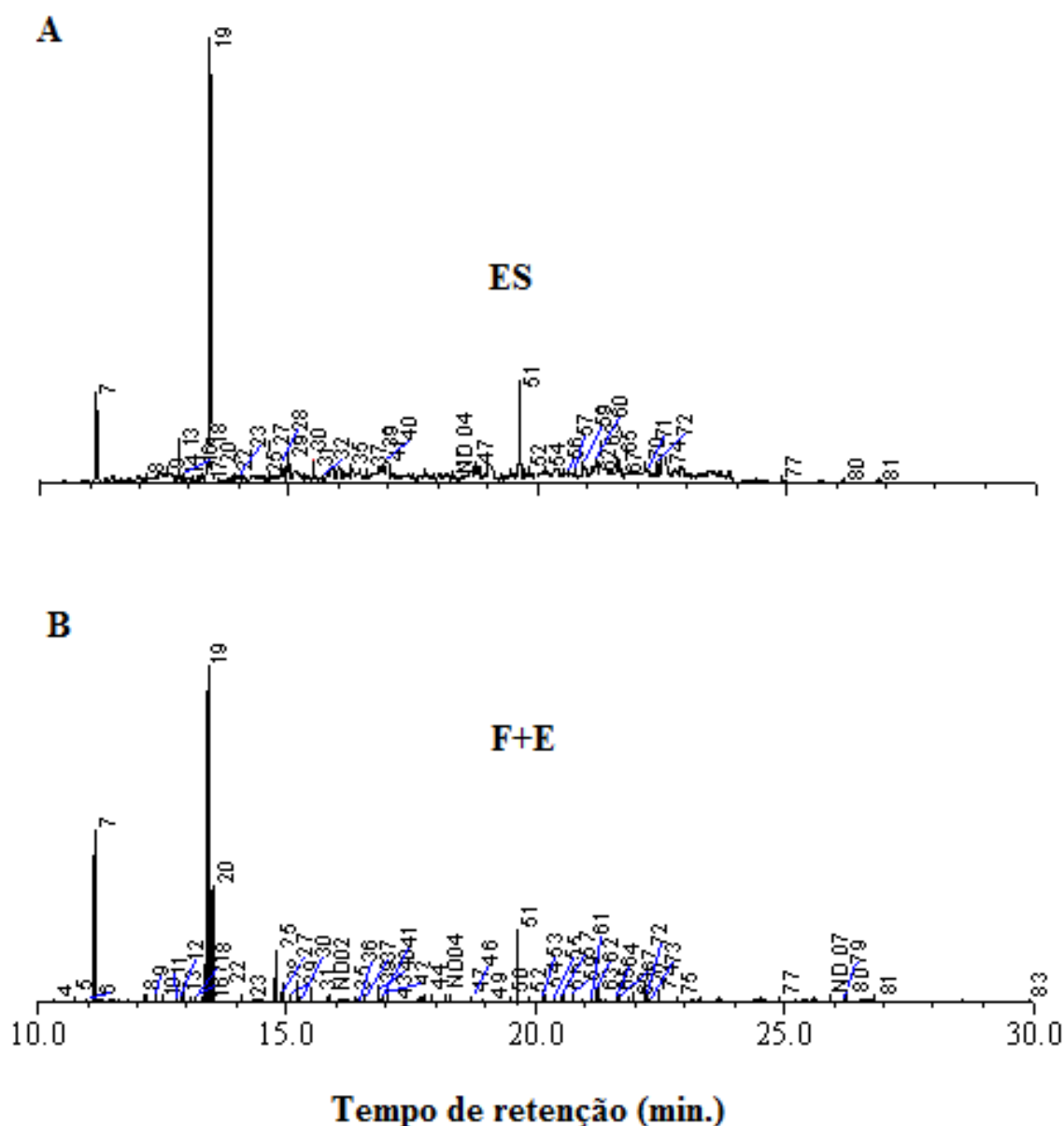


Figura 4. Cromatogramas representativos dos voláteis coletados de (A) ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* sem adultos de *Costalimaita ferruginea* (ES) e de (B) fêmeas adultas se alimentando nos ramos de eucalipto (F+E). Viçosa/MG, 2012. α -Pinenos (7); β -Pinenos (8); Sulcatona (9); β -Mirceno (10); Decano (11); Octanal (12); α -Felandreno (13); Acetato de (3Z)-hexenila (14); Isobutirato de isoamila (15); α -Terpineno (16); o-Cimeno (17); Limone (18); Eucaliptol (19); (Z)- β -Ocimeno (20); (E)- β -ocimeno (22); δ -Terpineno (23); α -Terpinoleno (25); Undecano (27); Linalool (28); Nonanal (29); (3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (30); allo-Ocimeno (31); neo-allo-Ocimeno (32); Borneol (35); Benzoato de Etila (36); Terpinen-4-ol (37); Butirato de (3Z)-hexenila (38); α -Terpineol (39); Dodecano (40); Salicilato de metila (41); Metilchavicol (42); Decanal (43); Geraniol (44); Geranial (46); Tridecano (47); 2-Butiloctanol (49); Bicycloelemeno (50); Acetato de α -terpinila (51); α -Cubebeno (52); Acetato de geranila (53); α -Copaeno (54); Tetradecano (55); β -Cubebeno (56); β -Elemeno (57); α -Gurjuneno (59); β -Cariofileno (60); Benzoato de Isoamila (61); β -Gurjuneno (62); Geranil acetona (63); Cadina-3,5-dieno (64); α -Cariofileno (65); Allo-Aromadendreno (67); δ -Gurjuneno (68); Pentadecano (69); Bicyclgermacreno (70); α -Muuroleno (71); γ -Cadineno (72); Cubebol (73); δ -Cadineno (74); trans-Cadina-1,4-dieno (75); Heptadecano (77); Tetradecanoato de etila (79); Octadecano (80); Acetato de (2E,6E)-farnesila (81); Heneicosano(83); ND - Não identificado.

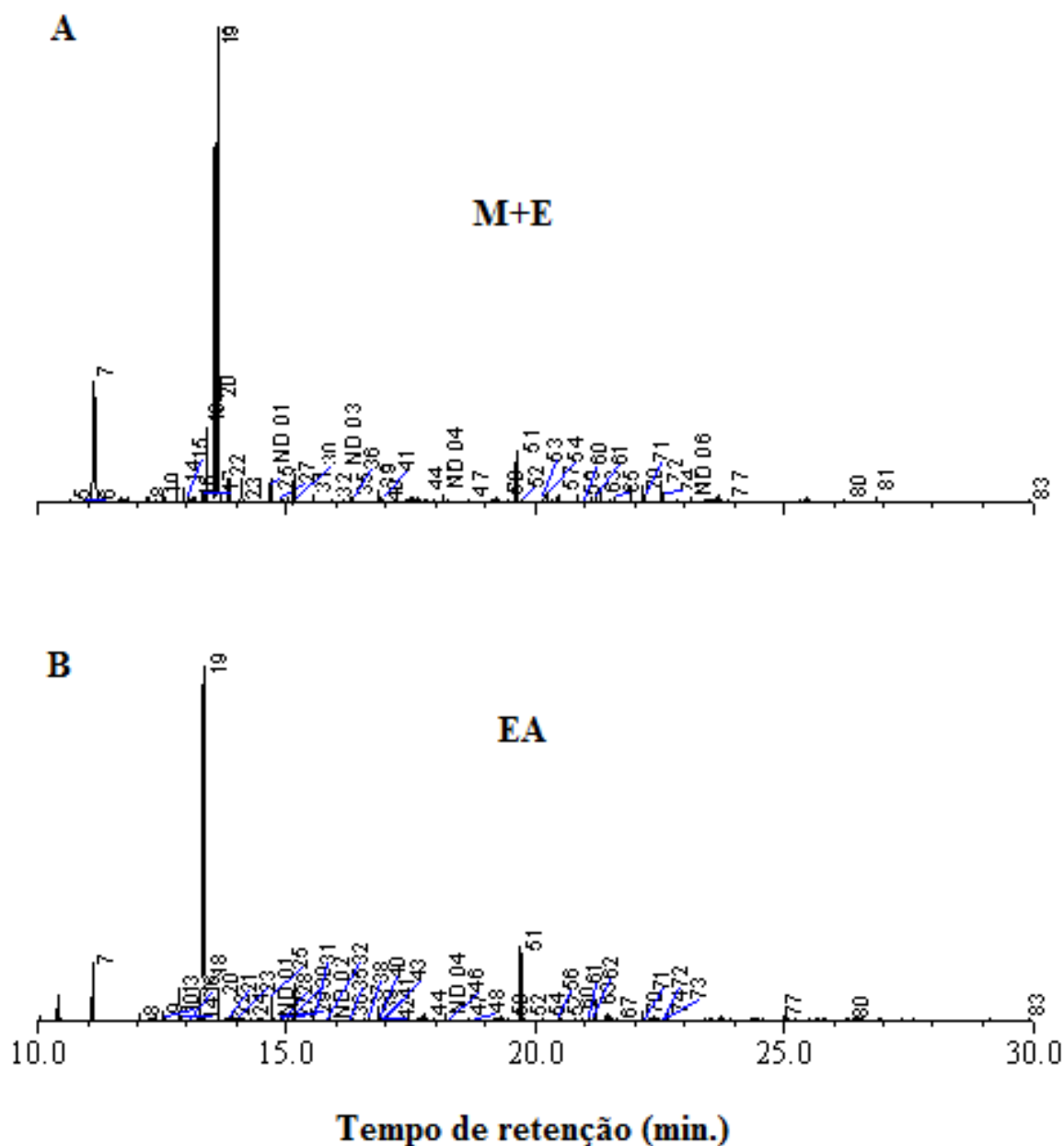


Figura 5. Cromatogramas representativos dos voláteis coletados de (A) machos adultos de *Costalimaita ferruginea* se alimentando de ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* (F+E) e de (B) ramos de eucalipto após a alimentação dos besouros (EA). Viçosa/MG, 2012. α -Pinenos (7); β -Pinenos (8); Sulcatona (9); β -Mirceno (10); Decano (11); Octanal (12); α -Felandreno (13); Acetato de (3Z)-hexenila (14); Isobutirato de isoamila (15); α -Terpineno (16); o-Cimeno (17); Limone (18); Eucaliptol (19); (Z)- β -Ocimeno (20); 2-Feniletanol (21); (E)- β -ocimeno (22); δ -Terpineno (23); Octan-1-ol (24); α -Terpinoleno (25); Undecano (27); Linalool (28); Nonanal (29); (3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (30); allo-Ocimeno (31); neo-allo-Ocimeno (32); Borneol (35); Benzoato de Etila (36); Terpinen-4-ol (37); Butirato de (3Z)-hexenila (38); α -Terpineol (39); Dodecano (40); Salicilato de metila (41); Metilchavicol (42); Decanal (43); Geraniol (44); Geranial (46); Tridecano (47); Indol (48); 2-Butiloctanol (49); Bicycloelemeno (50); Acetato de α -terpinila (51); α -Cubebeno (52); Acetato de geranila (53); α -Copaeno (54); Tetradecano (55); β -Cubebeno (56); β -Elemeno (57); α -Gurjuneno (59); β -Cariofileno (60); Benzoato de Isoamila (61); β -Gurjuneno (62); Geranil acetona (63); Cadina-3,5-dieno (64); α -Cariofileno (65); Allo-Aromadendreno (67); Pentadecano (69); Bicyclgermacreno (70); α -Muuroleno (71); γ -Cadineno (72); Cubebol (73); δ -Cadineno (74); trans-Cadina-1,4-dieno (75); Heptadecano (77); Octadecano (80); Acetato de (2E,6E)-farnesila (81); Heneicosano(83); ND - Não identificado.

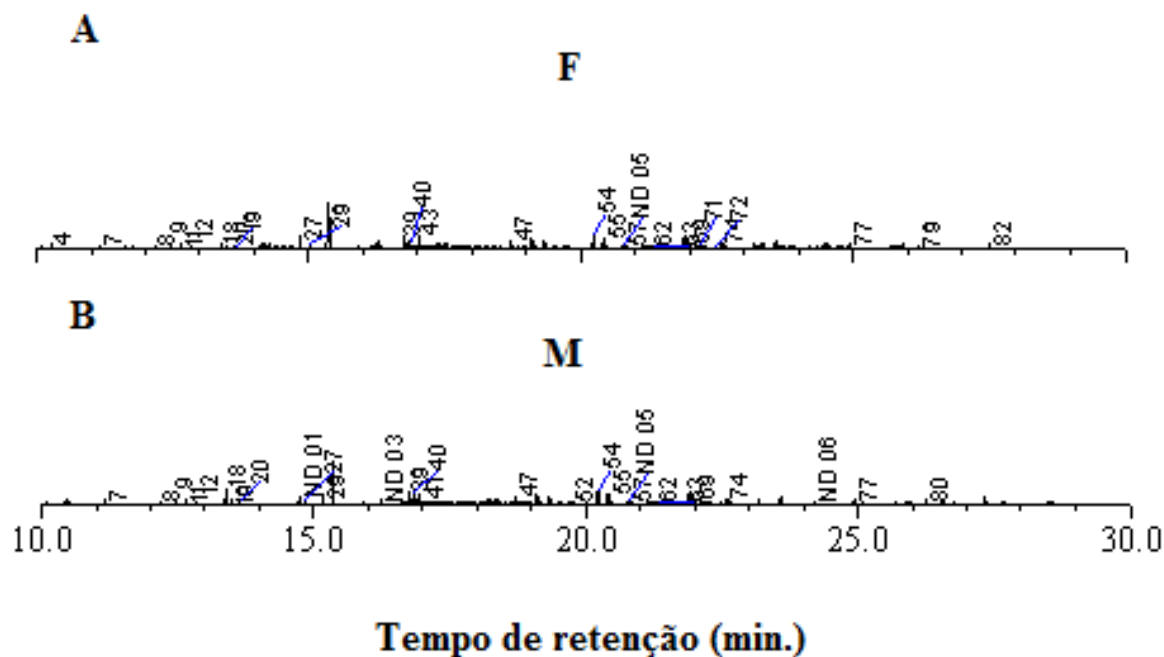


Figura 6. Cromatogramas representativos dos voláteis coletados de (A) fêmeas (F) e de (B) machos (M) de *Costalimaita ferruginea*. Viçosa/MG, 2012. α -Pineno (7); β -Pineno (8); Sulcatona (9); Decano (11); Octanal (12); Limone (18); Eucaliptol (19); (Z)- β -Ocimeno (20); Undecano (27); Nonanal (29); α -Terpineol (39); Dodecano (40); Salicilato de metila (41); Decanal (43); Tridecano (47); α -Cubebeno (52); α -Copaeno (54); Tetradecano (55); β -Elemeno (57); α -Gurjuneno (59); β -Gurjuneno (62); Geranyl acetona (63); Dodecanol (66); Allo-Aromadendreno (67); Pentadecano (69); α -Muuroleno (71); γ -Cadineno (72); δ -Cadineno (74); Heptadecano (77); Tetradecanoato de etila (79); Octadecano (80); Salicilato de benzila (82); ND - Não identificado.

Os compostos identificados neste trabalho puderam ser divididos em três grupos: (i) compostos liberados exclusivamente por adultos de *C. ferruginea* (sozinhos ou em associação com o eucalipto); (ii) compostos liberados pelo eucalipto sem ataque, mas que foram detectados em outros tratamentos e (iii) compostos liberados pelo eucalipto durante e após a herbivoria. A seguir, serão apresentados para os compostos de cada grupo os Índices de Kovats (IK) e os tempos de retenções (TR) obtidos nas análises em cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massa; o IK dos compostos obtidos na literatura em coluna DB-5 e as concentrações médias dos compostos para cada tratamento em que eles foram detectados (n=5). Por fim, serão apresentados detalhes dos compostos não identificados. Vale ressaltar que a numeração dos compostos seguiu a ordem de eluição em coluna DB-5.

2.3.1. Compostos exclusivamente liberados nos tratamentos com insetos adultos

Na Tabela 2 se encontram os compostos específicos identificados nas amostras dos tratamentos M, F, M+E e F+E. Um aldeído e três alcanos ocorreram apenas nos tratamentos com a presença de adultos de *C. ferruginea*. Em relação aos compostos

específicos dentro desse grupo, dois compostos foram exclusivos do tratamento F, o álcool **Dodecan-1-ol** e o **Salicilato de benzila**. No tratamento F+E, apareceram três compostos exclusivos, entre eles o sesquiterpeno, **δ -Gurjuneno**. Em comum a esses dois tratamentos foram encontrados dois compostos, o **Heptanal** e o **Tetradecanoato etila** (Tabela 2). Estes compostos parecem ser exclusivamente liberados pelos insetos porque não foram detectados nos tratamentos com eucalipto sem ataque ou após a herbivoria.

Tabela 2. Compostos presentes nos voláteis coletados de fêmea e machos adultos de *Costalimaita ferruginea* sozinhos ou em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis*. Viçosa-MG, 2012.

Nº	Composto	TR (min)	IK cal.	IK lit.*	Concentração (ng μ L ⁻¹)			
					M	F	M+E	F+E
<i>Alcanos</i>								
11	Decano	12,69	999	1000	1,97 ⁽³⁾	0,67 ⁽³⁾	1,71 ⁽⁵⁾	1,15 ⁽³⁾
55	Tetradecano	20,38	1398	1400	0,81 ⁽³⁾	0,98 ⁽⁵⁾	0,86 ⁽⁵⁾	0,85 ⁽⁵⁾
69	Pentadecano	21,97	1498	1500	2,65 ⁽⁵⁾	1,78 ⁽⁵⁾	4,12 ⁽⁵⁾	5,52 ⁽⁵⁾
<i>Álcoois</i>								
49	2-Butiloctanol	18,91	1277	1277	-	-	-	0,74 ⁽⁵⁾
66	Dodecanol	21,62	1470	1470	-	0,69 ⁽²⁾	-	-
<i>Aldeídos</i>								
4	Heptanal	10,30	900	902	-	0,38 ⁽⁴⁾	-	0,69 ⁽²⁾
12	Octanal	12,80	1004	998	1,82 ⁽³⁾	0,95 ⁽³⁾	3,95 ⁽³⁾	4,95 ⁽³⁾
<i>Aromático</i>								
82	Salicilato de benzila	27,51	1894	1865	-	1,92 ⁽²⁾	-	-
<i>Ésteres</i>								
79	Tetradecanoato de etila	26,20	1793	1796	-	0,21 ⁽²⁾	-	0,58 ⁽²⁾
<i>Sesquiterpenos hidrocarbonetos</i>								
68	δ -Gurjuneno	21,79	1477	1477	-	-	-	2,08 ⁽⁵⁾

*Índices de Kovats (IK) para coluna DB-5 obtidos em ADAMS (2007). TR – tempo de retenção médio. Números entre parêntese indicam a quantidade de amostras (n=5) de cada tratamento em que determinado composto foi identificado. M – Macho sozinho; F – fêmea sozinha; M+E – machos se alimentando do eucalipto; F+E – fêmeas se alimentando do eucalipto.

Outro composto encontrado nos tratamentos de fêmeas de *C. ferruginea* sozinha e em associação com clones híbridos de *E. urophylla* vs. *E. grandis*, foi o **Decanal** (nº 43), mas além desses dois tratamentos ele também foi encontrado nas amostras do tratamento EA. Para este composto o IK e IK obtido em coluna DB-5 e disponível na literatura (ADAMS, 2007) foram de 1208 e 1201, respectivamente, com tempo de retenção médio de 17,01 min. O composto foi detectado em todas as amostras dos três tratamentos e as

concentrações foram de 4,76, 8,78 e 12,23 ng μL^{-1} , para os tratamentos EA, F e F+E, respectivamente.

2.3.2. Compostos liberados pelo eucalipto sem ataque, mas que foram detectados em outros tratamentos

Um total de 44 compostos foi detectado nos voláteis liberados por ramos de eucalipto, sendo que apenas um não foi identificado. Do total de compostos identificados para esse tratamento, 19 compostos parecem ser produzidos exclusivamente pelo eucalipto, mesmo que estes tenham sido detectados nos tratamentos M+E, F+E e EA. Já 24 compostos além do eucalipto também apareceram nos demais tratamentos, incluindo os tratamentos de machos e fêmeas sozinhos. Assim, este segundo grupo de compostos pode ser subdividido em dois subgrupos: (1) compostos comuns aos tratamentos com o eucalipto, ou seja, presentes nos tratamentos M+E, F+E e EA (Tabela 3) e (2) compostos comuns a todos os tratamentos, incluindo os tratamentos F e M (Tabela 4).

Os compostos detectados no subgrupo 1 foram identificados como sendo três ésteres, 11 monoterpenos (sendo cinco oxigenados), cinco sesquiterpenos (sendo um oxigenado) e um terpeno irregular (Tabela 3). Todos os compostos foram encontrados em todas as cinco amostras obtidas para todos os tratamentos inclusos nesse subgrupo.

Tabela 3. Compostos emitidos por ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* e que foram encontrados nos voláteis emitidos por machos e fêmeas de *Costalimaita ferruginea* durante e após a alimentação dos besouros. Viçosa-MG, 2012.

Nº	Composto	TR (min.)	IK cal.	IK lit.*	Concentração (ng µL ⁻¹)			
					ES	EA	M+E	F+E
<i>Ésteres</i>								
14	Acetato de (3Z)-hexenila	12,89	1008	1002	4,27 ⁽⁵⁾	4,10 ⁽⁵⁾	13,21 ⁽⁵⁾	12,89 ⁽⁵⁾
51	Acetato de α-terpinila	19,67	1357	1349	67,66 ⁽⁵⁾	58,91 ⁽⁵⁾	48,11 ⁽⁵⁾	51,60 ⁽⁵⁾
<i>Monoterpeno hidrocarbonetos</i>								
13	α-Felandreno	12,83	1006	1002	29,70 ⁽⁵⁾	25,34 ⁽⁵⁾	18,01 ⁽⁵⁾	29,07 ⁽⁵⁾
16	α-Terpineno	13,12	1020	1017	1,45 ⁽⁵⁾	2,25 ⁽⁵⁾	1,29 ⁽⁵⁾	2,76 ⁽⁵⁾
17	o-Cimeno	13,30	1028	1026	1,56 ⁽⁵⁾	1,36 ⁽⁵⁾	2,50 ⁽⁵⁾	3,49 ⁽⁵⁾
22	(E)-β-ocimeno	13,81	1052	1050	1,16 ⁽⁵⁾	5,02 ⁽⁵⁾	9,91 ⁽⁵⁾	13,44 ⁽⁵⁾
23	δ-Terpineno	14,07	1064	1059	5,34 ⁽⁵⁾	3,93 ⁽⁵⁾	3,19 ⁽⁵⁾	6,00 ⁽⁵⁾
25	α-Terpinoleno	14,72	1092	1088	27,75 ⁽⁵⁾	24,19 ⁽⁵⁾	18,85 ⁽⁵⁾	40,21 ⁽⁵⁾
<i>Monoterpeno oxigenado</i>								
28	Linalool	14,92	1101	1096	1,64 ⁽⁵⁾	2,64 ⁽⁵⁾	3,85 ⁽⁵⁾	6,36 ⁽⁵⁾
31	allo-Ocimeno	15,53	1133	1132	11,98 ⁽⁵⁾	6,7 ⁽⁵⁾	9,08 ⁽⁵⁾	11,58 ⁽⁵⁾
32	neo-allo-Ocimeno	15,79	1147	1144	1,16 ⁽⁵⁾	0,68 ⁽⁵⁾	2,53 ⁽⁵⁾	2,75 ⁽⁵⁾
35	Borneol	16,35	1174	1169	3,93 ⁽⁵⁾	2,47 ⁽⁵⁾	2,68 ⁽⁵⁾	3,38 ⁽⁵⁾
37	Terpinen-4-ol	16,55	1184	1177	2,18 ⁽⁵⁾	2,42 ⁽⁵⁾	6,66 ⁽⁵⁾	5,48 ⁽⁵⁾
<i>Sesquiterpenos hidrocarbonetos</i>								
56	β-Cubebeno	20,44	1402	1388	2,08 ⁽⁵⁾	1,20 ⁽⁵⁾	1,88 ⁽⁵⁾	2,01 ⁽⁵⁾
60	β-Cariofileno	20,97	1436	1419	2,73 ⁽⁵⁾	0,81 ⁽⁴⁾	0,73 ⁽³⁾	0,57 ⁽³⁾
65	α-Cariofileno	21,53	1471	14,54	0,17 ⁽³⁾	0,08 ⁽³⁾	0,13 ⁽³⁾	0,08 ⁽²⁾
70	Biciclogermacreno	22,21	1513	1500	8,90 ⁽⁵⁾	7,83 ⁽⁵⁾	17,40 ⁽⁵⁾	24,30 ⁽⁵⁾
<i>Sesquiterpenos oxigenados</i>								
81	Acetato de (2E,6E)-farnesila	26,87	1846	1846	1,17 ⁽⁵⁾	3,53 ⁽⁵⁾	4,17 ⁽⁵⁾	3,69 ⁽⁵⁾
<i>Terpenos irregulares</i>								
30	DMNT ¹	15,26	1119	-	0,19 ⁽⁵⁾	0,15 ⁽⁵⁾	3,45 ⁽⁵⁾	4,16 ⁽⁵⁾

Índices de Kovats (IK) para coluna DB-5 obtidos em *ADAMS (2007). TR – Tempo de retenção médio. Números entre parêntese indicam a quantidade de amostras (n=5) de cada tratamento em que determinado composto foi identificado. ¹(3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno. ES – ramos de eucalipto sem ataque; EA – ramos de eucalipto após alimentação dos besouros; M+E – machos em associação com o eucalipto; F+E – fêmeas em associação com o eucalipto.

No subgrupo 2, foram identificados quatro alcanos, um aldeído, uma cetona, seis monoterpenos, sendo dois oxigenados, e oito sesquiterpenos, sendo um oxigenado (Tabela 4). Entre os sesquiterpenos, apenas **α-Copaeno**, **δ-Cadineno** e **Geranil acetona** foram encontrados em 100% das amostras dos seis tratamentos. Para o tratamento F, no entanto, cinco compostos não foram detectados (**Octadecano**, **Salicilato de metila**, **α-Cubebeno** e **α-Gurjuneno**).

Tabela 4. Compostos emitidos por ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* e encontrados nos tratamentos de machos e fêmeas de *Costalimaita ferruginea* sozinhos, machos e fêmeas se alimentando do eucalipto e do eucalipto após alimentação dos besouros. Viçosa-MG, 2012.

Nº	Composto	TR (min)	IK cal.	IK lit.*	Concentração (ng µL ⁻¹)					
					M	F	ES	EA	M+E	F+E
<i>Alcanos</i>										
27	Undecano	14,88	1099	1100	3,91 ⁽⁵⁾	8,85 ⁽⁵⁾	0,96 ⁽⁵⁾	2,17 ⁽⁵⁾	3,54 ⁽⁵⁾	8,72 ⁽⁵⁾
40	Dodecano	16,86	1199	1200	2,54 ⁽⁵⁾	0,76 ⁽⁴⁾	0,52 ⁽³⁾	1,89 ⁽³⁾	5,06 ⁽⁵⁾	0,42 ⁽³⁾
47	Tridecano	18,69	1299	1300	1,38 ⁽⁴⁾	0,71 ⁽³⁾	3,28 ⁽⁵⁾	2,13 ⁽⁵⁾	1,81 ⁽⁵⁾	1,76 ⁽⁵⁾
77	Heptadecano	24,93	1699	1700	1,73 ⁽³⁾	0,46 ⁽³⁾	3,33 ⁽³⁾	1,47 ⁽³⁾	1,40 ⁽⁵⁾	1,50 ⁽⁵⁾
80	Octadecano	26,28	1799	1800	1,61 ⁽²⁾	-	1,20 ⁽³⁾	0,77 ⁽³⁾	0,85 ⁽⁴⁾	1,98 ⁽³⁾
<i>Aldeído</i>										
29	Nonanal	15,01	1106	1100	2,71 ⁽⁵⁾	2,17 ⁽⁵⁾	7,72 ⁽⁵⁾	6,42 ⁽⁵⁾	5,02 ⁽⁵⁾	5,65 ⁽⁵⁾
<i>Cetona</i>										
9	Sulcatona	12,43	990	985	1,54 ⁽⁵⁾	1,77 ⁽⁵⁾	6,49 ⁽⁵⁾	6,79 ⁽⁵⁾	9,67 ⁽⁵⁾	15,29 ⁽⁵⁾
<i>Éster aromático</i>										
41	Salicilato de metila	16,93	1203	1191	3,16 ⁽³⁾	-	3,32 ⁽²⁾	2,43 ⁽²⁾	2,56 ⁽³⁾	3,94 ⁽³⁾
<i>Monoterpenos hidrocarbonetos</i>										
7	α-Pineno	11,11	938	939	1,24 ⁽⁵⁾	0,68 ⁽⁵⁾	70,36 ⁽⁵⁾	64,58 ⁽⁵⁾	108,90 ⁽⁵⁾	139,94 ⁽⁵⁾
8	β-Pineno	12,20	981	979	0,34 ⁽³⁾	0,46 ⁽⁴⁾	3,91 ⁽⁵⁾	4,30 ⁽⁵⁾	6,96 ⁽⁵⁾	10,06 ⁽⁵⁾
18	Limoneno	13,40	1033	1029	10,50 ⁽⁵⁾	2,16 ⁽⁵⁾	30,10 ⁽⁵⁾	22,31 ⁽⁵⁾	30,71 ⁽⁵⁾	35,81 ⁽⁵⁾
20	(Z)-β-Ocimeno	13,59	1042	1037	1,07 ⁽³⁾	0,98 ⁽³⁾	18,67 ⁽⁵⁾	23,76 ⁽⁵⁾	100,71 ⁽⁵⁾	94,18 ⁽⁵⁾
<i>Monoterpenos oxigenados</i>										
19	Eucaliptol	13,47	1037	1031	2,42 ⁽⁵⁾	0,85 ⁽⁵⁾	322,12 ⁽⁵⁾	289,35 ⁽⁵⁾	371,28 ⁽⁵⁾	262,20 ⁽⁵⁾
39	α-Terpineol	16,81	1197	1188	3,00 ⁽⁵⁾	1,35 ⁽⁵⁾	14,90 ⁽⁵⁾	13,19 ⁽⁵⁾	14,81 ⁽⁵⁾	26,28 ⁽⁵⁾
<i>Sesquiterpenos hidrocarbonetos</i>										
52	α-Cubebeno	19,77	1363	1348	0,02 ⁽³⁾	-	2,08 ⁽⁵⁾	1,28 ⁽⁵⁾	0,99 ⁽⁵⁾	1,43 ⁽⁵⁾
54	α-Copaeno	20,20	1388	1376	0,94 ⁽⁵⁾	0,62 ⁽⁵⁾	8,38 ⁽⁵⁾	4,34 ⁽⁵⁾	4,42 ⁽⁵⁾	6,75 ⁽⁵⁾
57	β-Elemeneno	20,46	1403	1390	0,27 ⁽³⁾	0,31 ⁽³⁾	1,93 ⁽⁵⁾	1,82 ⁽⁵⁾	2,46 ⁽⁵⁾	4,98 ⁽⁵⁾
59	α-Gurjuneno	20,79	1424	1409	0,28 ⁽²⁾	-	3,82 ⁽⁵⁾	2,47 ⁽⁵⁾	2,04 ⁽⁵⁾	2,5 ⁽⁵⁾
62	β-Gurjuneno	21,23	1452	1433	0,37 ⁽³⁾	0,28 ⁽³⁾	1,52 ⁽⁵⁾	1,65 ⁽⁵⁾	1,92 ⁽⁵⁾	3,68 ⁽⁵⁾
67	Allo-Aromadendreno	21,66	1478	1460	0,15 ⁽²⁾	0,12 ⁽²⁾	4,43 ⁽⁵⁾	2,41 ⁽⁵⁾	2,58 ⁽⁵⁾	4,54 ⁽⁵⁾
71	α-Muuroleno	22,22	1514	1500	0,20 ⁽³⁾	0,17 ⁽³⁾	2,58 ⁽⁵⁾	1,60 ⁽⁵⁾	6,78 ⁽⁵⁾	7,94 ⁽⁵⁾
72	γ-Cadineno	22,47	1531	1513	3,14 ⁽⁵⁾	0,08 ⁽⁴⁾	0,33 ⁽⁵⁾	0,29 ⁽⁵⁾	19,10 ⁽⁵⁾	0,44 ⁽⁵⁾
74	δ-Cadineno	22,57	1538	1524	2,18 ⁽⁵⁾	0,41 ⁽⁵⁾	7,12 ⁽⁵⁾	7,91 ⁽⁵⁾	8,64 ⁽⁵⁾	7,77 ⁽⁵⁾
<i>Sesquiterpenos oxigenados</i>										
63	Geranil acetona	21,32	1457	1455	0,91 ⁽⁵⁾	1,72 ⁽⁵⁾	13,85 ⁽⁵⁾	16,34 ⁽⁵⁾	15,94 ⁽⁵⁾	15,41 ⁽⁵⁾

Índices de Kovats (IK) para coluna DB-5 obtidos em *ADAMS (2007). TR – Tempo de retenção médio. Números entre parênteses indicam a quantidade de amostras (n=5) de cada tratamento em que determinado composto foi identificado. M – macho; F – fêmea; ES – ramos de eucalipto sem ataque; EA – ramos de eucalipto após a hebevorria; M+E – machos em associação com o eucalipto; F+E – fêmeas em associação com o eucalipto.

Os compostos emitidos por ramos de eucalipto e detectados em altas concentrações foram **Eucaliptol**, **α -Pineno**, **Acetato de α -terpinila**, **Limoneno**, **α -Felandreno** e **α -Terpinoleno**. Quando os insetos foram introduzidos no sistema, alterações no padrão de emissão de certos compostos pelo eucalipto puderam ser claramente percebidas. Uma dessas alterações foi o aumento na emissão dos compostos **α -Pinene**, **Biciclogermacreno**, **Acetato de (3Z)-hexenila**, **(3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno**, **Sulcatona**, **(Z)- β -Ocimeno** e **α -Muuroleno**. Já um comportamento inverso aconteceu com o composto **Acetato de (2E,6E)-farnesila**, que na presença dos besouros teve suas emissões reduzidas. Entre os compostos comuns ao eucalipto e aos insetos sozinhos, a emissão dos compostos foram, na grande maioria, bem menores, com exceção dos alcanos, do aldeído e do sesquiterpeno, **γ -Cadineno**. Para este último, as emissões foram maiores nos tratamentos com machos.

2.3.3. *Compostos liberados pelo eucalipto durante e após a herbivoria*

Vinte e dois compostos foram emitidos exclusivamente nos voláteis de híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* durante (M+E e F+E) e após a alimentação de *C. ferruginea* (EA). Assim, para este grupo, três subgrupos de compostos foram observados: (1) compostos emitidos durante e após a alimentação dos besouros (Tabela 5); (2) compostos emitidos apenas durante a alimentação (Tabela 6) e; (3) compostos liberados após a alimentação dos besouros (Tabela 7). No primeiro caso, 11 compostos apareceram nos três tratamentos, sendo um alcano, uma cetona, dois ésteres, quatro monoterpênos (sendo três oxigenados) e dois sesquiterpênos. O **β -Mirceno** e o **Bicicloelemeno** estiveram presentes em todas as amostras dos tratamentos M+E e F+E, mas apareceram apenas em três amostras do tratamento EA. O **Geraniol** e o **Cubebol** também foram frequentes nos tratamentos M+E e F+E, ocorrendo em menor frequência no tratamento EA. A emissão de **β -Mirceno**, no tratamento F+E, parece ter sido bem maior do que nos outros tratamentos e **Butirato de (3Z)-hexenila** não foi detectado nas amostras do tratamento M+E.

Tabela 5. Compostos emitidos por ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* durante a alimentação de adultos machos (M+E) e fêmeas (F+E) de *Costalimaita ferruginea* e após a alimentação dos besouros (EA). Viçosa-MG, 2012.

Nº	Composto	TR (min)	IK cálc.	IK lit.*	Concentração (ng µL ⁻¹)		
					M+E	F+E	EA
<i>Alcanos</i>							
83	Heneicosano	29,97	2099	2100	1,34 ⁽²⁾	0,75 ⁽²⁾	0,59 ⁽³⁾
<i>Cetona</i>							
2	Hexan-3-ona	6,95	792	783 ¹	0,53 ⁽²⁾	1,49 ⁽³⁾	0,22 ⁽²⁾
<i>Ésteres</i>							
36	Benzoato de Etila	16,4	1177	1173	3,17 ⁽³⁾	2,85 ⁽³⁾	2,06 ⁽²⁾
38	Butirato de (3Z)-hexenila	16,64	1189	1186	-	0,91 ⁽³⁾	1,08 ⁽²⁾
61	Benzoato de Isoamila	21,14	1446	1435	1,05 ⁽⁴⁾	2,17 ⁽³⁾	0,82 ⁽³⁾
<i>Monoterpenos</i>							
10	β-Mirceno	12,51	992	990	4,78 ⁽⁵⁾	13,89 ⁽⁵⁾	1,20 ⁽³⁾
<i>Monoterpenos oxigenados</i>							
42	Metilchavicol	16,95	1204	1196	0,99 ⁽²⁾	0,38 ⁽²⁾	0,79 ⁽²⁾
44	Geraniol	17,93	1258	1252	0,65 ⁽⁴⁾	4,35 ⁽⁵⁾	2,63 ⁽³⁾
46	Geranial	18,25	1276	1267	2,89 ⁽²⁾	1,31 ⁽³⁾	0,67 ⁽²⁾
<i>Sesquiterpenos</i>							
50	Bicicloelemeno	19,41	1342	1326 ²	3,99 ⁽⁵⁾	1,69 ⁽⁵⁾	0,95 ⁽²⁾
73	Cubebol	22,47	1531	1515	0,60 ⁽⁴⁾	1,27 ⁽⁵⁾	1,20 ⁽²⁾

Índices de Kovats (IK) para coluna DB-5 obtidos em *ADAMS (2007), ZAIKIN & BORISOV (2002) e NICKAVAR (2006). TR – Tempo de retenção médio. Números entre parênteses indicam a quantidade de amostras (n=5) de cada tratamento em que determinado composto foi identificado.

No subgrupo 2, seis compostos foram emitidos durante a alimentação de machos e fêmeas de *C. ferruginea*, sendo dois ésteres, dois monoterpenos e dois sesquiterpenos (Tabela 6). A presença de **Cadina-3,5-dieno** só foi observada em duas amostras de cada tratamento.

Tabela 6. Compostos emitidos durante a alimentação de adultos machos e fêmeas de *Costalimaita ferruginea* em ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis*. Viçosa-MG, 2013.

Nº	Composto	TR (min)	IK cál.	IK lit.*	Concentração (ng µL ⁻¹)	
					M+E	F+E
<i>Ésteres</i>						
5	Isobutirato de isobutila	10,65	915	911	1,30 ⁽⁵⁾	1,98 ⁽⁴⁾
15	Isobutirato de isoamila	13,01	1014	1009	1,84 ⁽⁵⁾	3,90 ⁽⁵⁾
<i>Monoterpenos hidrocarbonetos</i>						
6	α-Tujeno	10,95	931	930	0,31 ⁽⁴⁾	0,55 ⁽⁵⁾
53	Acetato de geranila	20,16	1385	1381	3,50 ⁽³⁾	2,87 ⁽⁵⁾
<i>Sesquiterpenos hidrocarbonetos</i>						
64	Cadina-3,5-dieno	21,47	1467	1454**	0,21 ⁽²⁾	0,43 ⁽²⁾
75	trans-Cadina-1,4-dieno	22,73	1548	1534	0,42 ⁽⁴⁾	0,65 ⁽⁵⁾

Índices de Kovats (IK) para coluna DB-5 obtidos em *ADAMS (2007) e **COURTOIS et al. (2009). TR – tempo de retenção médio. Números entre parênteses indicam a quantidade de amostras (n=5) de cada tratamento em que determinado composto foi identificado. M+E – machos em associação com o eucalipto; F+E – fêmeas em associação com o eucalipto.

No subgrupo 3, cinco compostos foram detectados em híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* exclusivamente após a alimentação de adultos de *C. ferruginea*. Entre eles dois alcanos, um álcool, um aldeído aromático e o **Indol**. No entanto, a quantidade de amostras em que esses compostos foram detectados foi menor ou igual a três (Tabela 7).

Tabela 7. Compostos emitidos exclusivamente por ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* após alimentação por adultos de *Costalimaita ferruginea*. Viçosa-MG, 2012.

Nº	Composto	TR (min)	IK cál.	IK lit.*	Concentração (ng µL ⁻¹)
<i>Alcanos</i>					
1	2-Metil-heptane	6,28	776	760 ¹	0,44 ⁽³⁾
3	Octano	7,33	799	800	0,76 ⁽³⁾
<i>Álcool</i>					
21	2-Feniletanol	13,73	1048	1042	0,39 ⁽²⁾
24	Octan-1-ol	14,21	1070	1068	0,65 ⁽²⁾
<i>Indol</i>					
48	Indol	18,76	1303	1291	1,97 ⁽³⁾

Índices de Kovats (IK) para coluna DB-5 obtidos em *ADAMS (2007) e ¹ZAIKIN & BORISOV (2002). TR – tempo de retenção médio. Números entre parênteses indicam a quantidade de amostras (n=5) de cada tratamento em que determinado composto foi identificado.

2.3.4. Compostos não identificados

Para sete compostos não foi possível fazer a identificação (Tabela 8), pois os espectros de massa não foram encontrados na literatura consultada e nem um padrão de similaridade foi apresentado pelas bibliotecas NIST08 e WILEY7. Dois deles foram encontrados em todas as amostras dos tratamentos com machos de *C. ferruginea*. O composto não identificado 01 também parece ser exclusivo dos tratamentos com machos, se não fosse a ocorrência no tratamento EA. Entretanto, as emissões deste composto foram claramente maiores nos tratamentos com machos, sendo que a emissão desse volátil foi 5 vezes maior quando os machos estavam se alimentando do eucalipto. O composto não identificado 07 foi exclusivo do tratamento F+E e o não identificado 02, além desse tratamento, também ocorreu no tratamento EA, mas apenas três amostras continham o composto. O composto não identificado 05 é mais um dos compostos comuns a machos e fêmeas e o composto não identificado 04 ocorreu só em tratamentos com o eucalipto.

Tabela 8. Compostos não identificados presentes nos voláteis obtidos de machos (M) e fêmeas (F) de *Costalimaita ferruginea* sozinhos, machos (M+E) e fêmeas (F+E) em associação como ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis*, eucalipto sozinho (ES) e após alimentação dos besouros (EA). Viçosa-MG, 2012.

n°	Composto	RT (min)	IK cálc.	Concentração (ng μL^{-1})					
				M	F	ES	EA	M+E	F+E
26	ND 01	14,75	1094	4,98 ⁽⁵⁾	-	-	0,08 ⁽⁵⁾	25,73 ⁽⁵⁾	-
33	ND 02	15,79	1146	-	-	-	0,95 ⁽³⁾	-	6,42 ⁽⁵⁾
34	ND 03	16,26	1170	3,42 ⁽⁵⁾	-	-	-	2,03 ⁽⁵⁾	-
45	ND 04	18,17	1272	-	-	2,63 ⁽⁵⁾	5,2 ⁽⁵⁾	8,14 ⁽⁵⁾	6,42 ⁽⁵⁾
58	ND 05	20,60	1412	0,89 ⁽⁵⁾	0,81 ⁽⁵⁾	-	-	-	-
76	ND 06	24,19	1648	2,61 ⁽⁵⁾	-	-	-	4,93 ⁽⁵⁾	-
78	ND 07	25,96	1776	-	-	-	-	-	2,24 ⁽⁵⁾

IK - Índices de Kovats; TR – tempo de retenção médio; ND – Não identificado. Números entre parênteses indicam a quantidade de amostras (n=5) de cada tratamento em que determinado composto foi identificado.

2.4. Discussão

Os onze compostos encontrados apenas nas coletas de voláteis de adultos de *C. ferruginea* parecem ser emitidos exclusivamente pelos besouros, principalmente os alcanos, que mesmo que o maior deles seja de 15 carbonos, atípico em hidrocarbonetos produzidos em Chrysomelidae, é possível que, por terem sido detectados nas análises cromatográficas, eles tenham sido liberados nas fezes. Os hidrocarbonetos presentes em algumas espécies de crisomelídeos são formados basicamente por mo, di e tri-metil alcanos de cadeia longa (DUBIS et al., 1987; NIKOLOVA et al., 1999; NELSON et al., 2002; 2003; NELSON & CHARLET, 2003; PETERSON et al. 2007; GEISELHARDT et al.,

2009a). Esses hidrocarbonetos podem ser produzidos pela cutícula ou serem liberados nos excrementos. Segundo Nikolova et al. (1999), dos hidrocarbonetos produzidos por *Chrysomela vigintipunctata* (Scopoli) aqueles liberados nas fezes são constituídos por alcanos de menor cadeia carbônica (menor que 15 carbonos) e encontrados com maior frequência nas fezes do que na cutícula.

Os constituintes dos feromônios em Chrysomelidae apresentam uma grande diversidade de tipos sendo que compostos derivados de terpenos (BARTELT et al., 2002), álcoois (COSSE et al., 2005), aldeídos (ZILKOWSKI et al 2006) e ésteres (GUSS et al., 1982) já foram demonstrados como componentes de feromônios. Fêmeas de *C. ferruginea*, sozinhas ou durante a alimentação no eucalipto, produziram dois compostos exclusivos, um aldeído (**Decanal**) e um éster (**Tetradecanoato de etila**) e de forma semelhante nos tratamentos com machos, dois compostos, não identificados, também foram detectados (Tabela 8). Esses compostos são, portanto, fortes candidatos a um feromônio.

As análises cromatográficas dos voláteis liberados pelos ramos de eucalipto sem ataque e obtidos em *headspace* revelaram a presença de 43 compostos, sendo que apenas um não foi identificado. A maior classe foi constituída por sesquiterpenos hidrocarbonetos (28,6%), sendo que **Biciclogermacreno**, **α -Copaeno**, **δ -Cadineno** foram os compostos com a maior concentração dentro dessa classe. A segunda classe com a maior quantidade de compostos foi a dos monoterpenos hidrocarbonetos, destacando os compostos **α -Pineno**, **Limoneno**, **α -Felandreno**, **α -Terpinoleno** e **(Z)- β -Ocimeno**. Na terceira classe com maior quantidade de compostos, os monoterpenos oxigenados (16,7%), o destaque é para o **Eucaliptol**, que foi o composto que registrou as maiores concentrações em todas as coleções de voláteis com a presença do eucalipto. Já na quarta classe, os alcanos (11,9%), o composto com maior concentração dentro desse grupo foi o **Octadecano**. Entre os ésteres (7,14%) o destaque fica com o **Acetato de α -terpenila** e entre os sesquiterpenos oxigenados (4,8%) o **Geranil acetona** foi o composto com maior concentração dentro desse grupo. Finalmente, aparecem os grupos da cetona, aldeído e do terpeno irregular com apenas um composto detectado.

Os voláteis de óleos extraídos de folhas de eucalipto variam enormemente em sua constituição e taxa de emissão dos compostos de uma espécie de eucalipto para outra (ELAISSI et al. 2011a; 2011b), bem como os voláteis de folhas obtidos em *headspace* (ZINI et al., 2002; 2003a; 2003b). Essa variabilidade pode se dar até mesmo individualmente entre folhas novas e folhas velhas (BOUWER, 2010) e de acordo com o ritmo circadiano do eucalipto (ZINI et al., 2002; 2003a; 2003b). No entanto, um aspecto

comum entre esses trabalhos é a presença do monoterpene oxigenado, **Eucaliptol**, como um dos constituintes majoritários. Além disso, a classe de compostos dominantes é a dos terpenoides (hemi, mono e sesquiterpenos) (BOUWER, 2010), corroborando os resultados obtidos no presente trabalho.

Os terpenoides são metabólitos secundários biossintetizados através da rota do ácido mevalônico (PORTER & SPURGEON, 1981) e representam a maior classe de compostos presente nos óleos essenciais de espécies do gênero *Eucalyptus*. Entre eles destacam-se os monoterpenos **α -Pineno** e **α -Terpineol**, e os sesquiterpenos, **Aromadendreno** e **Globulol** (ZINI et al., 2003b). Zini et al. (2003a) detectaram no *headspace* ou nos óleos hidrodestilados de folhas de *Corymbia citriodora* (= *Eucalyptus citriodora*) (Hill & Johnson), *E. dunnii* Maiden e *E. saligna* Sm. um total de 60 compostos. Yuvaraj et al. (2013) encontraram 12 compostos majoritários nas folhas de *E. cordata* após aeração em *headspace*. Já Araújo et al. (2010), ao estudarem os óleos de híbridos de *E. urophylla* vs. *E. grandis*, identificaram 10 compostos dos 21 detectados, representados em sua maioria por mono e sesquiterpenos com destaque para **α -Cimeno**, **Eucaliptol**, **α -Terpineol**, e **Acetato de α -terpenila**, que também foram encontrados no presente estudo.

Zini et al. (2001) encontraram como compostos majoritários presentes nas folhas de *C. citriodora* os compostos **Citronelol**, **β -Cariofileno** e **Isopreno**, e como compostos minoritários **α -Tujene**, **Sabineno**, **β -Mirceno**, **Isopulegol** e **α -Cariofileno**. De acordo com esses autores o **β -Cariofileno**, teve sua emissão cessada pelo eucalipto na presença de *Pseudococcus longispinus* (Targioni Tozzetti) (Hemiptera: Pseudococcidae). No presente trabalho este composto não foi um dos majoritários, mas sua concentração parece ter diminuído na presença dos insetos. Este comportamento, no entanto, não é claro, e possivelmente devido a alta reatividade do **α** e **β -Cariofileno** (ZINI et al., 2001) os resultados podem ser diferentes. Outro composto encontrado neste trabalho e que teve suas concentrações, aparentemente, reduzidas na presença dos besouros foi o **Acetato de (*E,E*)-farnesila**.

É bem conhecido que plantas produzem em seus tecidos vegetativos uma mistura de diferentes voláteis quando estão estressadas ou sendo atacadas por herbívoros (DUDAREVA et al., 2006; BOUWER, 2010). O composto **(*3E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno** (DMNT) e seu homólogo 4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno (TMTT) encontrados em plantas são conhecidos por aumentarem suas concentrações durante a herbivoria (LOUGHRIN et al., 1994; BUTTERY et al., 2000) para atrair inimigos naturais dos herbívoros (DE MORAES et al., 1998). Estes compostos mais o **β -Ocimeno** fazem

parte de uma mistura de voláteis emitida por *Alnus glutinosa* (L.) (Betulaceae) que possivelmente tornam essas árvores e seus vizinhos mais resistentes ao ataque de *Agelastica alni* L. (Coleoptera: Chrysomelidae) (AZUMA et al., 1997), ou seja, contribuem para uma comunicação entre plantas. O DMNT foi encontrado apenas nos tratamentos com o eucalipto e suas concentrações aumentaram nos tratamentos em que os insetos foram adicionados, assim como o dos compostos **Biciclogermacreno**, **α -Pineno**, **(E)- β -ocimeno**, **(Z)- β -Ocimeno** e **α -Muuroleno**, com isso esses compostos podem fazer parte de uma mistura liberada pelo eucalipto para atrair inimigos naturais e/ ou sinalizar para as outras plantas a presença de herbívoros. Entretanto, os principais constituintes dessas misturas de defesa da planta são os voláteis de folha verde (VFFV's), responsáveis por induzir a produção de mais monoterpenos quando as plantas são atacadas (NUNES & PIO, 2001). No presente trabalho o único volátil de folha verde que parece participar dessa mistura foi o **Acetato de (3Z)-hexenila**, uma vez que a emissão desse composto pelo eucalipto foi aumentada na presença dos besouros. Os demais álcoois e ésteres encontrados nos voláteis de clones híbridos de *E. urophylla* vs. *E. grandis* provavelmente fazem parte desse grupo de voláteis.

Entre as classes de voláteis liberados pelo eucalipto estão os hidrocarbonetos, alcanos e alcenos (BROUWER, 2010). Alcanos de nove a 18 carbonos e outros alcenos foram encontrados nos extratos de flores de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh (GIAMAKIS et al., 2001). No presente trabalhos cinco alcanos foram identificados como constituintes dos voláteis de híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis*, tendo ocorrido também nos voláteis dos besouros sozinhos. A ocorrência desses hidrocarbonetos em insetos já foi discutida anteriormente e, dada as suas simplicidades estruturais, podem estar sendo liberados nos excrementos e, uma possível variação nas suas emissões, pode ocorrer quando o inseto está se alimentando da planta hospedeira. A presença nos dois sistemas, entretanto, pode ter ocorrido de forma concomitante.

Outro ponto de destaque no presente trabalho foi a presença de compostos emitidos pelo eucalipto e que foram detectados nos voláteis de adultos de *C. ferruginea*. De acordo com Muller & Hilker (2004), diversos estudos em crisomelídeos têm demonstrado a agregação dos indivíduos em resposta às pistas fecais depositadas na planta. Em *Altica carduorum* (Guérin-Méneville), Wan & Harris (1996) relataram a agregação de adulto nas fezes liberadas por larvas e adultos durante a alimentação na sua planta hospedeira, sugerindo que compostos atrativos e/ou metabolitos da planta são concentrados no intestino e excretados nas fezes. Se as fezes de crisomelídeos atraem coespecíficos, esse

comportamento precisa ser desvendado. Entretanto, os resultados apresentados sugerem que os besouros adultos podem sequestrar compostos da planta hospedeira liberando-os diretamente nas fezes ou os utilizando na biossíntese de feromônios.

Os voláteis liberados por adultos de *C. ferruginea* e por híbridos de *E. urophylla* vs. *E. grandis*, foram caracterizados nestes trabalho. Nos voláteis emitidos pelo besouro-amarelo, alguns compostos são fortes candidatos a um feromônio, dois foram produzidos exclusivamente pela fêmea sozinha ou durante a alimentação no eucalipto e outros dois foram produzidos pelos machos de forma similar, mas não foram identificados. A constituição dos voláteis emitidos pela planta sem ataque seguiu um padrão já observado e relatado na literatura, sendo o **Eucaliptol** o constituinte majoritário. Em termos quantitativos a associação do besouro-amarelo com o eucalipto alterou a taxa de emissão de certos compostos que, possivelmente, sejam utilizados pela planta como uma mistura de voláteis uteis em suas defesas contra herbívoros. Tais compostos liberados pelo eucalipto e pelo besouro possuem potencial uso no monitoramento e controle das populações do besouro-amarelo no campo. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados para identificar os verdadeiros papéis desses compostos na interação inseto-inseto e inseto-planta.

Capítulo 3

Resposta eletroantenográfica de *Costalimaita ferruginea* (Fabricius, 1801) (Coleoptera: Chrysomelidae) aos componentes voláteis de coespecíficos e da planta hospedeira

3.1 Introdução

O gênero *Eucalyptus* contém algumas das espécies madeiras mais cultivadas ao redor do mundo (SANTOS et al., 2004). No Brasil, a área plantada com essa essência florestal atingiu, em 2012, 5,1 milhões de hectares, um crescimento de 4,5% em relação ao ano anterior (ABRAF, 2013). Os plantios com espécies deste gênero têm um papel fundamental no setor florestal brasileiro e, conseqüentemente, na economia nacional, servindo como fonte de matéria-prima para produção de celulose e papel, produtos sólidos e produção de energia, colaborando assim para a diminuição da pressão exercida sobre as florestas naturais (SIMÕES et al., 1981; PERECIN, 2003). Em adição à produção madeira, os óleos essenciais extraídos do eucalipto são muito apreciados pela indústria farmacêutica, e algumas espécies também são utilizadas na arborização urbana e como quebra ventos (DOUGHTY, 2000).

Como a produção de madeira de eucalipto depende da fotossíntese gerada pelas folhas, qualquer fator que altere sua área foliar pode afetar a produção de material lenhoso (CEULEMANS & SAUGIER, 1991), representando um fator limitante na produção primária e até mesmo na sobrevivência das árvores cultivadas (COULSON & WITTER, 1984). Nesse contexto, os insetos desfolhadores se destacam, pois os danos causados às árvores reduzem a taxa fotossintética (SHEPERD, 1994), o que pode resultar na inviabilidade de qualquer empreendimento florestal com eucalipto. Assim, as árvores de eucalipto podem apresentar significativa redução na quantidade e qualidade da produção quando atacadas por estes insetos desfolhadores. Para ilustrar esta situação, no Brasil, MENDES (2004) avaliou e constatou uma perda de até 43% na produção de madeira de eucalipto causada por besouros desfolhadores.

O besouro-amarelo, *Costalimaita ferruginea* (Fabricius, 1801) (Crhysomelidae: Eumolpinae), é considerado o principal besouro-desfolhador de eucalipto no Brasil (ANJOS & MAJER, 2003). Sua presença já foi identificada em quase todo o território

nacional, causando danos, principalmente, em plantios de eucalipto (ANJOS, 1992). As injúrias causadas às árvores são produzidas principalmente pelos adultos, que logo após as primeiras chuvas emergem do solo para se alimentar das folhas e brotações novas (ANJOS, 1992), o que pode levar à mortalidade das árvores ou à redução do seu crescimento com reflexos em longo prazo na produção de madeira (m³/ha) (MENDES, 2004). As perdas nas dimensões dendrométricas dependem da intensidade dos surtos e da idade da árvore, sendo mais expressivas em árvores com até 12 meses de idade (MENDES, 1999, 2004). Segundo Anjos & Majer (2003), já foram registradas como plantas hospedeiras de *C. ferruginea* 19 espécies e dois híbridos de eucaliptos, sendo que *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *E. urophylla* S.T. Blake são as espécies com maior registro de ocorrência de ataques. Além do eucalipto, os autores também citam como hospedeiros outras espécies da família Myrtaceae como *Eugenia uniflora* L., *E. cuminii* (L.), *Psidium guajava* L. e *P. guineense* Sw.

O adulto de *C. ferruginea* possui forma quase elíptica, podendo atingir 6,5 mm de comprimento e 3,5 mm de largura; é de coloração amarelada e possui nos élitros pontos circulares escuros alinhados longitudinalmente (MARICONI, 1956). De acordo com Anjos (1992), os machos são pequenos, menos pesados, mais numerosos e têm o ciclo de vida mais curto do que as fêmeas. Estas, por sua vez, depositam cerca de 90 ovos que são liberados no solo, onde as larvas se desenvolvem, alimentando de raízes de gramíneas até a pupação. Produzem, frequentemente, uma geração por ano e, de acordo como Souza et al. (2008), os surtos populacionais coincidem com os meses de maior pluviosidade, entre novembro e dezembro.

Atualmente, o combate a estes insetos tem sido feito eficientemente apenas com inseticidas químicos sintéticos. Medidas de controle baseadas nos sistemas olfativos deste inseto, usando cairomônios da planta hospedeira ou feromônios, ainda não foram testadas. Além disso, quase nada se sabe sobre os sistemas de comunicação química de *C. ferruginea*.

Sinais químicos desempenham um importante papel na orientação de insetos, com misturas voláteis contendo informações espécie-específicas que podem ser usadas por herbívoros para o encontro de hospedeiros, sítios de oviposição e parceiros, ou para evitar competição por alimento (SCHOONHOVEN et al., 1996; MUSTAPARTA, 2002; DUDAREVA et al., 2006; BRUCE et al., 2005). O encontro de parceiros é facilitado por feromônios sexuais (CARDÉ & BAKER, 1984), enquanto feromônios de agregação podem ajudar tanto na localização de parceiros potenciais como de plantas hospedeiras

satisfatórias (BORDEN, 1985). Alguns insetos podem sequestrar ou adquirir compostos da planta hospedeira como os monoterpenos (BERDARD et al., 1969) e os voláteis de folhas verdes (VFV's) (DICKENS, 1989; DICKENS et al., 1990) e usá-los como feromônios ou como precursores destes (REDDY & GUERRERO, 2004). Outros insetos produzem ou liberam feromônios em resposta a pistas de sua planta hospedeira (DICKENS et al., 1992). Voláteis de planta podem, também, ter efeitos deterrentes ou repelentes que inibem a resposta de insetos ao feromônio, e alguns compostos liberados pela planta após a herbivoria podem atrair predadores e parasitoides (BERNASCONI et al. 1998; DE MORAES et al., 1998; 2001; ZEBELO et al. 2011).

Pistas olfativas de plantas hospedeiras têm sido intensivamente estudadas em diversas espécies da família Chrysomelidae. O primeiro trabalho que demonstrou a atração de crisomélídeos por voláteis emitidos pela planta foi realizado por McIndoo (1926) que evidenciou a atração de adultos de *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824 por voláteis emitidos pela batata. Essa atratividade e a identidade dos compostos foram confirmadas mais tarde por várias outros trabalhos (PANASIUK, 1984; KHALIOVA et al., 1998; MARTEL et al., 2005). Desde então, numerosos estudos de laboratório e de campo têm evidenciado o efeito de voláteis de planta em atrair espécies de crisomélídeos (PUTTICK et al, 1988; MORROW et al., 1989; PARK et al., 2004; ANDREWS et al., 2007; TÓTH et al., 2007).

Em *C. ferruginea* nenhum estudo foi realizados com o intuito de investigar a atratividade dos besouros aos componentes voláteis de coespecíficos e da planta hospedeira. O único registro de uma interação inseto-planta-inseto para esta espécie foi o relato de Anjos (1992), que descreveu o comportamento de agregação dos besouros ao se alimentarem das folhas de eucalipto, em um plantio comercial. De fato, em grandes surtos este comportamento é facilmente percebido. Diante disso, e com base na ecologia química descrita na literatura para outras espécies de crisomélídeos, foi feita a seguinte pergunta: qual sistema, inseto-inseto ou inseto-planta, é responsável por esse comportamento de agregação? Para tentar responder a essa pergunta, a técnica de detecção eletroantegráfica acoplada à cromatografia em fase gasosa foi utilizada para investigar se machos e fêmeas de *C. ferruginea* respondem a compostos presentes nos voláteis liberados por coespecíficos, sozinhos ou em associação com eucalipto, e a voláteis liberados pela planta após alimentação dos besouros. A presença de compostos bioativos poderá direcionar pesquisas futuras que busquem desenvolver ferramentas úteis no monitoramento ou controle das populações no campo, visando reduzir ou eliminar o uso de inseticidas.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Insetos

Adultos de *C. ferruginea*, de idade e status reprodutivos (acasalados ou virgens) desconhecidos, foram coletados em um plantio de *Eucalyptus urophylla*, plantado no espaçamento 3,0 X 3,0 m, com cerca de 30 meses de idade, localizado no município de Coimbra, Minas Gerais, Brasil (20°49'54,87"S e 42°51'58,28" O). Os besouros adultos foram coletados, manualmente, de novembro a dezembro de 2012, e todos os insetos capturados foram levados para o laboratório de Manejo de Pragas Florestais da Universidade Federal de Viçosa. Os insetos foram separados por sexo, de acordo com observações de Anjos (1992), colocados em potes de vidro (2L) contendo ramos de eucalipto para alimentação e acondicionados em câmara climática (25 °C, ± 70% de U.R e fotoperíodo de 12 horas) até sua utilização nas coletas de voláteis e nos testes com detector eletroantegráfico.

3.2.2. Espécie vegetal hospedeira

Os ramos de eucalipto utilizados na alimentação dos adultos de *C. ferruginea* e nas coletas de voláteis foram retirados de clones híbridos de *E. urophylla* vs. *E. grandis* cedidos pela Suzano Papel e Celulose. As mudas foram transplantadas para garrafas do tipo *pet* utilizando-se terra como substrato e mantidas no pátio do Laboratório de Manejo de Pragas Florestais da Universidade Federal de Viçosa (20°45'29,97"S e 42°52'7,24"O) até sua utilização.

3.2.3. Coleta de voláteis

As coletas de voláteis, em *headspace*, foram realizadas em um sistema fechado operado por uma bomba de vácuo (KNF Neuberger Laboport) que gerou um fluxo de ar (200 ml/min) contínuo dentro do sistema coletor. A câmara de aeração dos voláteis era constituída pela conexão de dois frascos de vidro, ligada ao sistema de ar a vácuo através de conectores e tubos de silicone. Em uma das extremidades foi adicionado um filtro de polímero Porapak Q contendo 20 mg do polímero para retenção de voláteis, e a outra extremidade estava conectada ao fluxo de ar umidificado e purificado por um filtro de carvão ativado. A coleta de voláteis foi realizada por um período de 24 horas com fotoperíodo de 12 horas. Após o período de coleta de voláteis, os filtros de Porapak foram lavados com 300 µL de hexano (Sigma Aldrich, EUA) para a dessorção dos compostos e as amostras obtidas foram concentradas a 70 µL. Posteriormente, foi adicionado a cada

amostra concentrada 30 μL de **Acetato de heptila** como padrão interno, na concentração de 30 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro (2 ml) e colocadas no congelador a -19°C , até sua utilização no eletroantenograma acoplado a cromatografia em fase gasosa (CG-EAD) e na cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

Para a determinação dos compostos específicos de cada sexo e de cada sexo em associação com o eucalipto, grupos separados de 20 machos e 20 fêmeas foram colocados na câmara de aeração com ou sem a presença de ramos de eucalipto. Quando os insetos foram colocados em associação com o eucalipto, foram usadas câmaras de aeração verticais. Neste caso, para a fixação e manutenção da turgidez dos ramos de eucalipto (cerca de 30 cm de comprimento), estes foram inseridos dentro da câmara de aeração em potes de vidro (20 ml) contendo água destilada e vedados na sua abertura superior por tiras de papel alumínio. Todo o sistema era trocado a cada 24 horas. Foram aerados ainda, por 24 horas, apenas ramos de eucalipto e ramos de eucalipto danificados após a alimentação dos besouros. Nesse último caso, 20 insetos (de sexo desconhecido) foram colocados em potes de vidro grande (5 L) contendo o ramo de eucalipto com sua haste inserida dentro de frascos de vidro (20 ml) contendo água destilada para manter a turgidez das folhas. Para impedir a entrada dos insetos dentro do frasco, este foi tampado na extremidade superior com algodão e vedado com Parafilm® e, para impedir a fuga e permitir a circulação de ar, a abertura superior do pote grande foi fechada com tecido *voal*.

O sistema foi mantido em câmara climática (temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas) por um período de 24 horas. Após esse período os insetos foram retirados com o auxílio de pinças e o ramo danificado foi utilizado na coleta de voláteis. Os ramos foram adicionados na câmara de aeração com suas hastes inseridas dentro de potes de vidro, conforme descrito anteriormente. Foram produzidas cinco amostras para cada uma das seguintes coleções de voláteis (tratamentos): machos sozinhos (M); fêmeas sozinhas (F); machos se alimentando de ramos do eucalipto (M+E); fêmeas se alimentando de ramos do eucalipto (F+E); ramos de eucalipto após a alimentação pelos besouros (EA) e; ramos de eucalipto sem ataque e sem insetos (ES).

3.2.4. Eletrofisiologia

As amostras concentradas e com padrão interno foram analisadas por um sistema acoplado de cromatografia gasosa-eletroantenografia (CG-EAD), utilizando-se um cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu GC-2010 acoplado a um sistema de detecção eletroantegráfica Syntech (Hilversum, Holanda) (Figura 7). O CG foi equipado com uma

coluna DB-5 (30 m X 0,25 mm d.i. X 0,25 μm de espessura de filme; Restek Chromatography Products, EUA). Foram injetadas alíquotas de 1 μL em modo *splitless* com a temperatura do injetor a 250°C. A temperatura do forno foi programada para aquecer 35 °C por 5 min e depois aumentada para 280°C em uma velocidade de 8 °C min^{-1} . O gás de arraste empregado foi o Hélio com um fluxo de 1,0 mL min^{-1} . O fluxo oriundo da coluna foi dividido em uma razão 1:1 com uma parte indo para o detector de ionização em chama (FID) e a outra parte indo para a linha de transferência aquecida e com uma corrente de ar umidificado que ia diretamente para a antena dos insetos.



Figura 7. Cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu GC-2010 acoplado a um sistema de detecção eletroantenográfica Syntech (Hilversum, Holanda) (CG-EAD). Viçosa-MG, 2012.

Os pares de antenas de machos e fêmeas de *C. ferruginea* foram retirados dos indivíduos vivos, com o auxílio de uma pinça e uma lupa estereoscópica, tendo-se o cuidado de remover as antenas o mais próximo possível da cavidade antenal. As antenas foram fixadas entre dois eletrodos de aço inox usando-se gel condutor (Sigma gel, Parker Labs., EUA). Das cinco amostras de voláteis obtidas para cada tratamento, duas foram selecionadas, aleatoriamente, para serem injetadas no CG-EAD. Apenas as amostras de eucalipto sem ataque não foram analisadas no detector eletroantenográfico. No total, 100 adultos (50 fêmeas e 50 machos) foram usados para testar as respostas aos tratamentos. O *software* Syntech CG-EAD32 (versão 4.6) foi usado para registrar as respostas.

3.2.5. Cromatografia gasosa e espectrometria de massa

Para investigar a estrutura molecular dos compostos que apresentaram alguma atividade biológica, as amostras de cada tratamento que elicitaram uma resposta nas antenas dos insetos foram analisados em um cromatógrafo em fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massa (CG-EM). As análises em CG-EM foram realizadas em um espectrômetro Shimadzu QP2010 SE, operando em modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV, acoplado a um cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu GC-2010 *Plus*. O CG-EM estava equipado com uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (J&W Scientific, Folson, Califórnia, EUA) e foi operado no modo de injeção *splitless* com injeção manual das amostras em alíquotas de 1 µL. O gás Hélio foi utilizado como gás de arraste em um fluxo de 4,0 mL min⁻¹. A temperatura de injeção foi de 250 °C. O programa de aquecimento do forno da coluna foi programado para aquecer 35 °C por 5 min e depois 8 °C min⁻¹ até 280 °C totalizando 40,63 min (tempo total de análise).

3.2.6. Identificação dos compostos

Para a identificação dos compostos que elicitaram alguma resposta nas antenas dos insetos utilizou-se os índices de Kovats (KI) calculado para cada composto e o espectro de massa gerado pelo *software* GCMSolution versão 2.7 para realização de comparações com os espectros de massa presentes nas bibliotecas do software (WILEY7 e NIST08) e com aqueles IK e espectro de massas disponíveis na literatura (ADAMS, 2007; EL-SAYED, 2013). Os KI's foram determinados em relação ao tempo de retenção (TR) utilizando uma solução estoque de uma mistura de hidrocarbonetos (C7-C30), obtidos em condições analíticas idênticas àsquelas usadas nas análises de CG-EM.

3.2.7. Análises estatísticas

Para avaliar o efeito de tratamento nas concentrações médias dos compostos que desencadearam alguma resposta eletroantenográfica em adultos de *C. ferruginea* foi utilizada a ANOVA *one-way*. Neste caso, para todos os tratamentos em que determinado composto foi detectado, inclusive no tratamento com voláteis de ramos de eucalipto sem ataque, as concentrações médias foram obtidas das cinco amostras geradas para cada tratamento. As médias foram comparadas entre si através do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas a 5% de probabilidade utilizando-se o *software* Stat Soft. STATISTICA (versão 8.0).

3.3. Resultados

Ao submeter às antenas de machos e fêmeas de *C. ferruginea* ao detector eletroantenográfico acoplado a cromatografia gasosa, frente aos tratamentos de machos (M) e fêmeas (F), machos (M+E) e fêmeas (F+E) em associação com o eucalipto e eucalipto após alimentação dos besouros (EA), observaram-se respostas para seis diferentes compostos (Figura 8). Estes compostos foram numerados de 1 a 6, de acordo com a ordem de eluição dos mesmos em coluna DB-5.

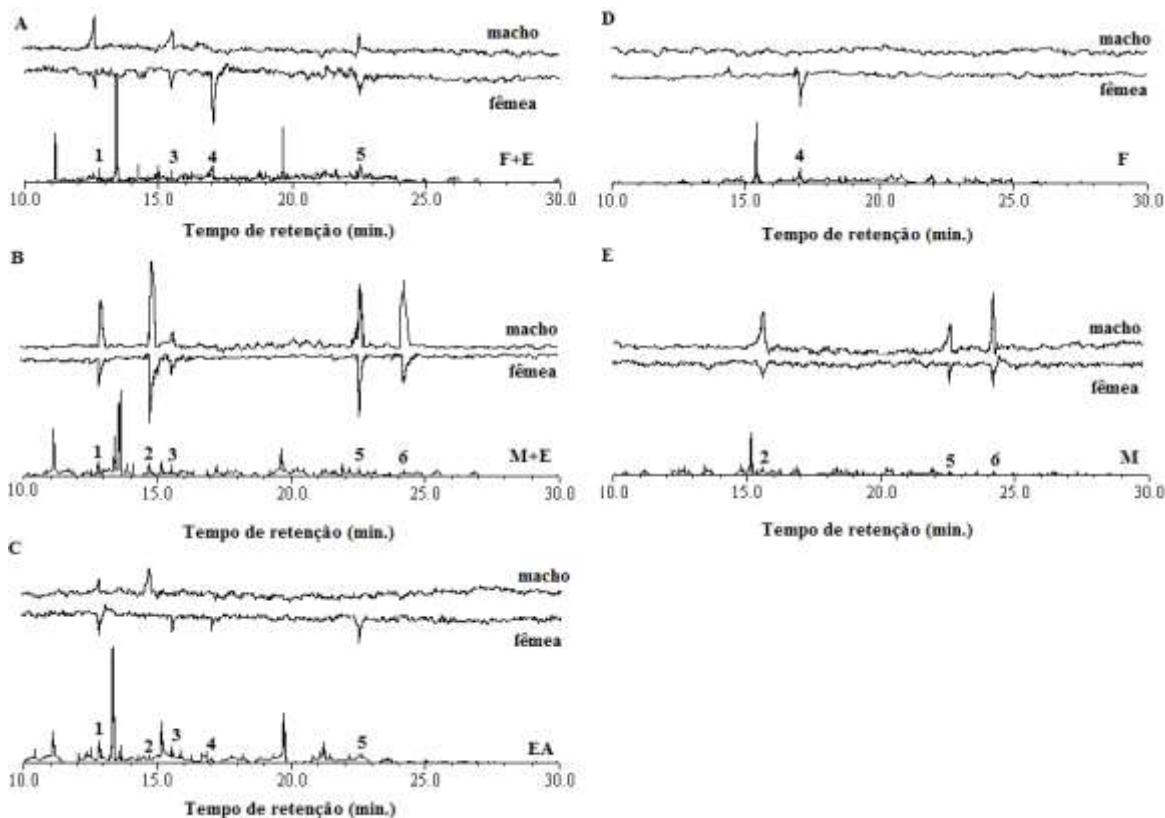


Figura 8. Respostas eletroantenográficas de machos e fêmeas adultos de *Costalimiata ferruginea* aos compostos voláteis liberados por (A) fêmeas em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* (F+E); (B) machos em associação com ramos de eucalipto (M+E); (C) ramos de eucalipto após a alimentação dos besouros (EA); (D) fêmeas sozinhas (F); (E) machos sozinhos (M). Viçosa/MG, 2013.

A seguir serão apresentadas, para cada composto, as respostas dos insetos, suas concentrações e informações sobre os seus perfis moleculares e, quando possível, uma identidade será sugerida com base nas comparações realizadas com os IK e espectro de massas similares àqueles encontrados na literatura e na biblioteca do *software* GCMSolution.

3.3.1. Composto 1

A presença do composto **1** foi constatada nos voláteis de fêmeas e machos de *C. ferruginea* em associação com ramos de eucalipto, em ramos de eucalipto após a alimentação dos besouros e nos voláteis obtidos apenas com ramos de eucalipto; no entanto, para este último, respostas eletrofisiológicas não foram realizadas. Para as duas amostras referentes ao tratamento F+E, dos 10 antenogramas de fêmeas, em seis uma resposta ao composto foi observada, e para os antenogramas de machos a mesma resposta apareceu em cinco dos 10 antenogramas. Já em relação às amostras M+E, a resposta foi observada em três e quatro dos antenogramas de fêmeas e machos, respectivamente. O mesmo estímulo também apareceu em dois antenogramas de fêmea e um de macho quando submetidos aos voláteis de EA. As concentrações das amostras referentes aos tratamentos em que o composto **1** apareceu e que foram utilizadas para gerar as respostas eletroantenográficas para cada sexo podem ser visualizadas na **Tabela 9**.

Tabela 9. Concentrações e respostas de adultos de *Costalimaita ferruginea* ao composto **1** presente nos extratos de machos e fêmeas em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* e a ramos do eucalipto após alimentação dos insetos. Viçosa/MG, 2012.

Voláteis	Amostra*	Concentração (ng μL^{-1})	Respostas observadas	
			Fêmeas	Machos
Fêmeas + eucalipto (F+E)	1	11,56	2	2
	2	14,00	4	3
Machos + eucalipto (M+E)	1	12,08	1	1
	2	13,07	2	3
Eucalipto após alimentação dos besouros (EA)	1	3,80	1	0
	2	3,95	1	1

* Para cada amostra foram gerados cinco antenogramas por sexo.

Ao submeter às concentrações médias do composto **1**, obtidas das cinco amostras produzidas para cada tratamento, incluindo as amostras referentes ao tratamento EA, à ANOVA *one-way*, verificou-se um efeito de tratamento na concentração do composto ($F_{(3,16)} = 468,75$; $p < 0,001$). Assim, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, as concentrações do composto **1** para F+E e M+E foram significativamente maiores do que em tratamentos que continham apenas o eucalipto. Não havendo, entretanto, diferenças estatísticas entre as médias obtidas em F+E ($12,89 \pm 0,42$ ng μL^{-1}) e M+E ($13,21 \pm 0,17$ ng μL^{-1}) e nem entre EA ($4,10 \pm 0,10$ ng μL^{-1}) e ES ($4,27 \pm 0,10$ ng μL^{-1}) (**Figura 9**).

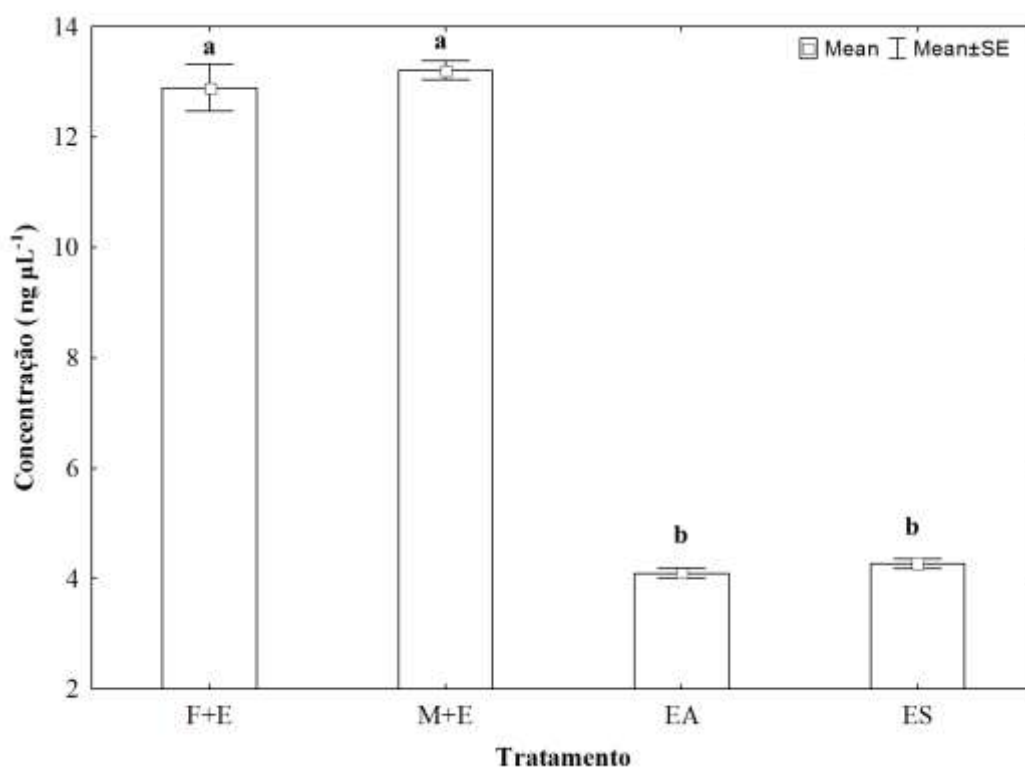


Figura 9. Concentração média \pm erro padrão do composto **1** nos tratamentos com fêmeas (F+E) e machos (M+E) de *Costalimaita ferruginea* em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis*, ramos de eucalipto após alimentação dos besouros (EA) e eucalipto sozinho (ES). (n=5) Colunas seguidas de letras distintas diferem significativamente (Tukey; $P < 0,05$).

O Índice de Kovats (IK) observado para o composto bioativo **1** em coluna DB-5[®] foi de 1002 e seu espectro de massa apresentou um pico do íon molecular (M⁺) com valor de m/z 93 Da e um pico base em m/z 142 Da (M⁺ - 49) (**Figura 10**). O espectro de massa gerado por este composto sugere uma fórmula molecular C₈H₁₄O₂. O acetato, **Acetato de (3Z)-hexenila**, foi sugerido pelas bibliotecas NIST08 e WILEY7 e comparações com informações disponíveis na literatura (ADAMS, 2007; EL-SAYED, 2013) confirmaram a similaridade entre os espectros de massa (**Figura 10**). O KI do acetato, para uma coluna DB-5, dada por Adams (2007), é de 1005.

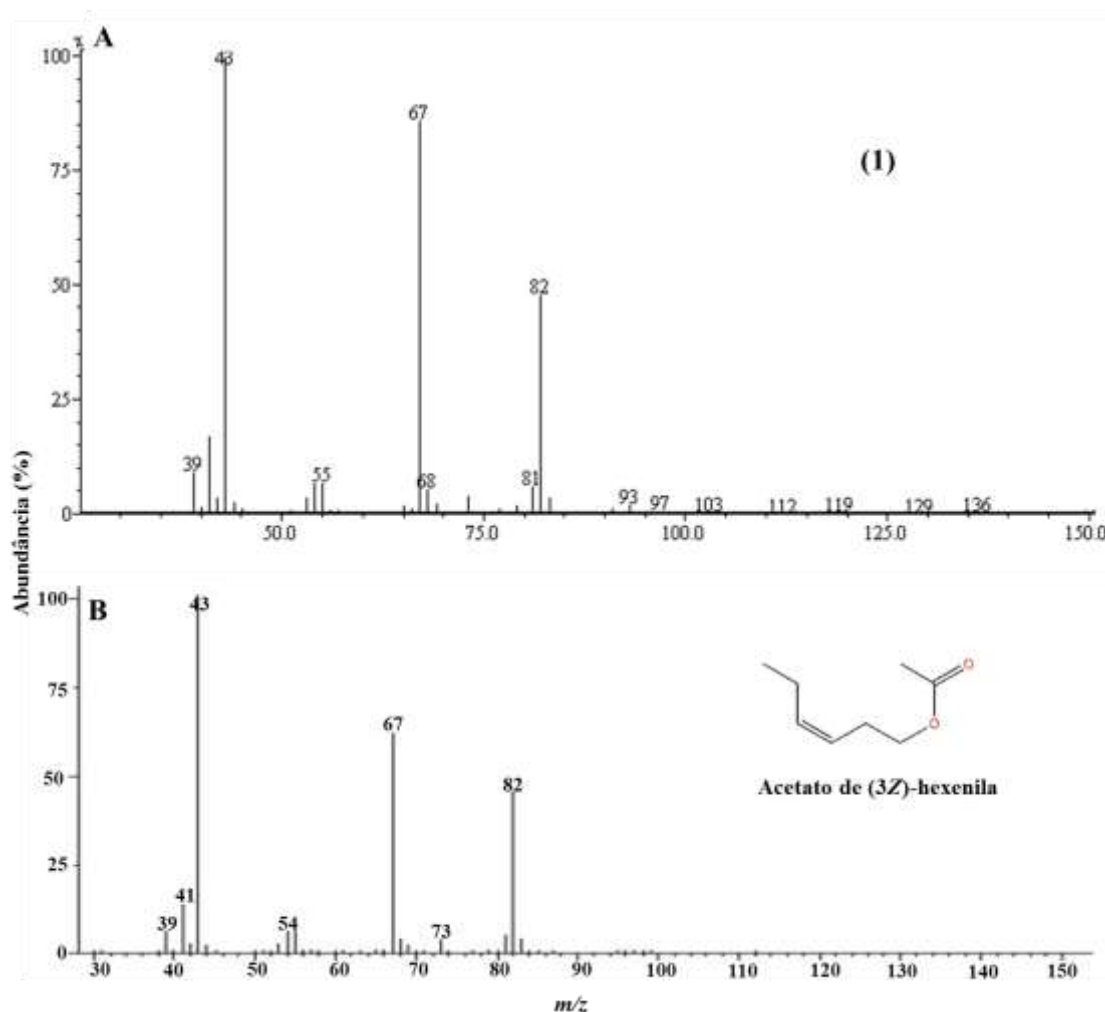


Figura 10. Espectro de massa referente ao composto **1** presente nos extratos de machos e fêmeas de *Costalimaita ferruginea* em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis*, ramos de eucalipto após alimentação dos besouros e de ramos de eucalipto sem ataque (A) e espectro de massa do acetato, **Acetato de (3Z)-hexenila** disponível na literatura (B) (fonte: El-Sayed 2013).

3.3.2. Composto 2

O composto **2** foi constatado nos tratamentos M, M+E e EA (Tabela 10). Os estímulos gerados pelos pares de antenas de fêmeas e de machos de *C. ferruginea* frente às amostras do tratamento M+E foram observados em seis e sete antenogramas, respectivamente. Já para as amostras do tratamento M apenas duas respostas, para cada sexo, foram observadas. Houve ainda uma resposta de fêmea a uma das amostras do tratamento EA.

Tabela 10. Concentrações e respostas de adultos de *Costalimaita ferruginea* ao composto 2 presente nos extratos de machos, machos em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. Grandis*, e de ramos de eucalipto após alimentação dos adultos. Viçosa/MG, 2012.

Voláteis	Amostra*	Concentração (ng μL^{-1})	Respostas observadas	
			Fêmeas	Machos
Machos + eucalipto (M+E)	1	29,33	3,0	3,0
	2	40,31	3,0	4,0
Machos (M)	1	3,25	1,0	1,0
	2	4,05	1,0	1,0
Eucalipto após alimentação dos besouros (EA)	1	0,25	0,0	1,0
	2	-	0,0	0,0

* Para cada amostra foram gerados cinco antenogramas por sexo

Houve diferença significativa entre os tratamentos em relação à concentração do composto 2 ($F_{(2,12)}=24,53$; $p<0,001$). A concentração média nas amostras do tratamento M+E ($25,73 \pm 4,72$ ng μL^{-1}) foi maior do que a concentração média do composto nos tratamentos M ($4,98 \pm 0,60$ ng μL^{-1}) e EA ($0,08 \pm 0,05$ ng μL^{-1}), que por sua vez não diferiram entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Figura 11).

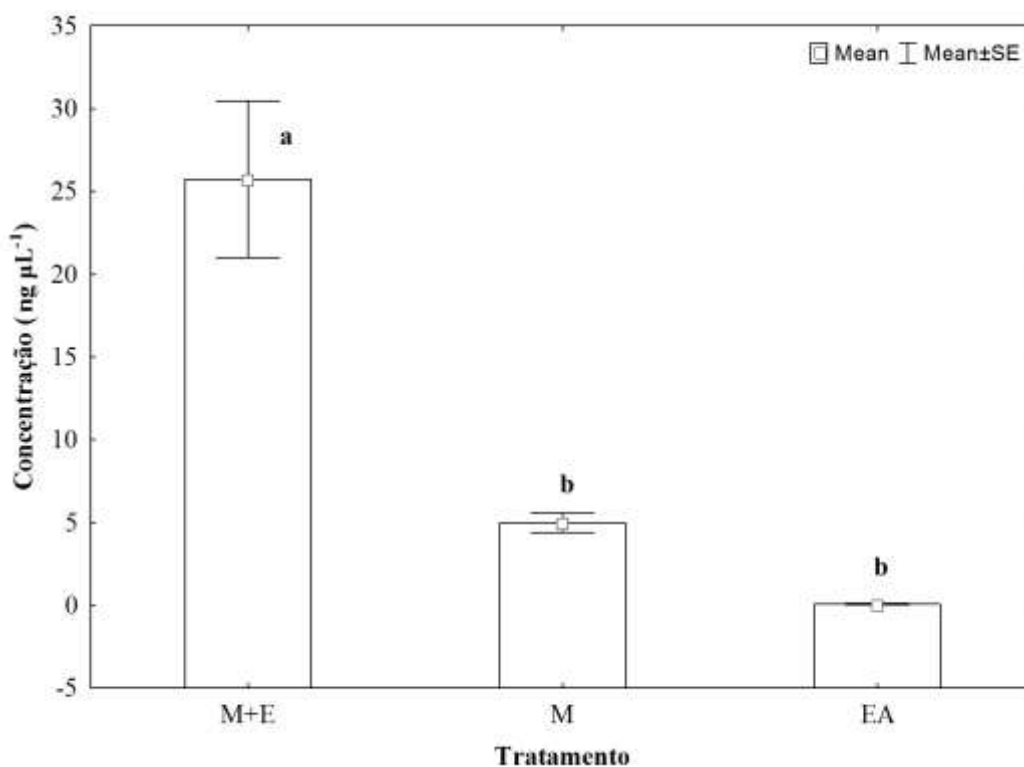


Figura 11. Concentração média \pm erro padrão do composto 2 presente nos tratamentos com machos de *Costalimaita ferruginea* (M), machos em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* (M+E) e de ramos de eucalipto após alimentação dos besouros (EA). (n=5) Colunas seguidas de letras distintas diferem significativamente (Tukey; $P<0,05$).

O IK do composto 2 presente nos extratos de machos e fêmeas de *C. ferruginea* em associação com o eucalipto foi de 1094. Seu espectro de massa apresentou um pico do íon molecular (M^+) com valor de m/z 170 Da e um pico base em m/z 43 Da ($M^+ - 85$) (Figura

12). Nenhum espectro de massa similar ao espectro do composto **2** foi sugerido pela biblioteca e, na literatura consultada, o espectro também não foi encontrado.

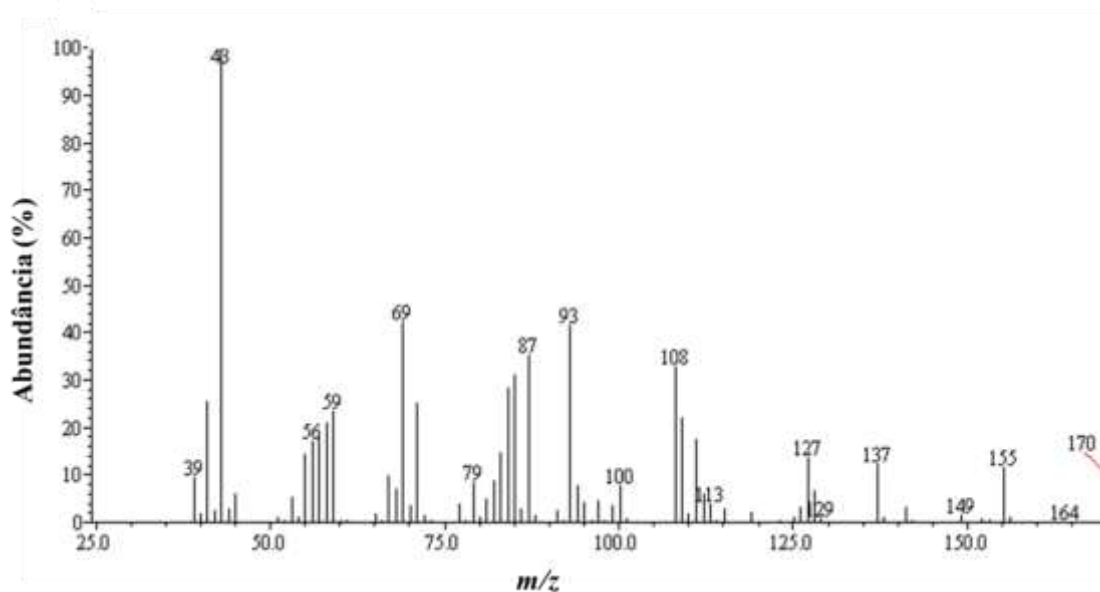


Figura 12. Espectro de massa referente ao composto **4** presente nos extratos de machos de *Costalimaita ferruginea*, machos em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* e em extratos de ramos de eucalipto após alimentação dos besouros.

3.3.3. Composto 3

O composto **3** também apresentou o mesmo padrão observado para o composto **1**, ou seja, esteve presente nos voláteis obtidos de machos e fêmeas de *C. ferruginea* em associação com eucalipto, de eucalipto após alimentação dos besouros e de ramos de eucalipto sem ataque e sem insetos (Tabela 11). Para as amostras do tratamento F+E, respostas a este composto foram observadas em sete antenogramas de machos e em seis de fêmeas. Já para o tratamento M+E, a resposta foi observada em quatro e cinco antenogramas de machos e fêmeas, respectivamente. O mesmo estímulo também foi registrado em um antenograma de fêmea frente ao tratamento EA. Para as amostras do tratamento ES não foram gerados antenogramas.

Tabela 11. Concentrações e respostas de adultos de *Costalimaita ferruginea* ao composto **3** presente nos voláteis de machos e fêmeas em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* e a ramos do eucalipto após alimentação dos insetos.

Voláteis	Amostra*	Concentração (ng μL^{-1})	Respostas observadas	
			Fêmeas	Machos
Fêmeas + eucalipto	1	21,59	2,0	2,0
	2	5,63	4,0	5,0
Machos + eucalipto	1	3,28	1,0	2,0
	2	4,39	3,0	3,0
Eucalipto após alimentação dos besouros	1	1,39	0,0	0,0
	2	3,82	1,0	0,0

* Para cada amostra foram gerados cinco antenogramas por sexo.

Pela ANOVA não houve efeito de tratamentos nas concentrações do composto **3** para os tratamentos em que ele esteve presente ($F_{(3,16)}=0,47$; $p=0,71$). Assim, as concentrações médias das amostras de M+E ($9,08 \pm 5,58 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), F+E ($11,58 \pm 2,68 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), EA ($6,70 \pm 2,04 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) e ES ($11,98 \pm 3,02 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) não diferem entre si (**Figura 13**).

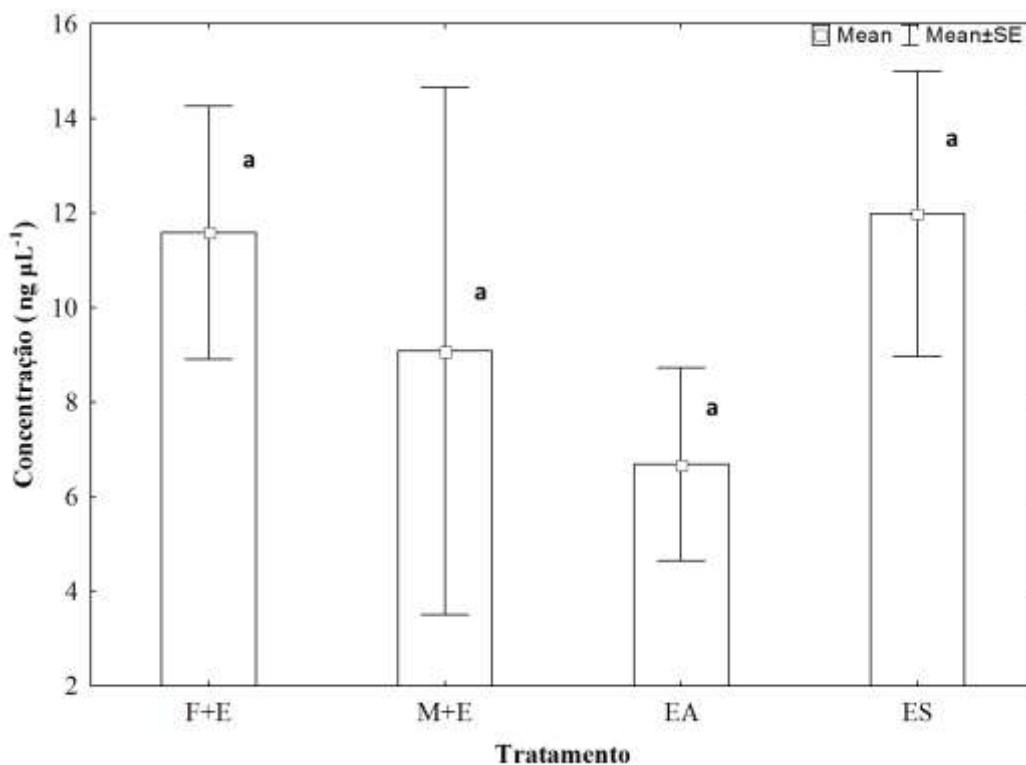


Figura 13. Concentração média \pm erro padrão do composto **3** presente nos tratamentos com fêmeas (F+E) e machos (M+E) de *Costalimaita ferruginea* em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis*, ramos de eucalipto após alimentação dos besouros (EA) e eucalipto sozinho (ES). (n=5) Colunas seguidas de letras distintas diferem significativamente (Tukey; $P<0,05$).

O IK do composto **3** foi determinado como sendo 1134 e o espectro de massa apresentou um pico do íon molecular (M^+) com valor de m/z 136 Da e um pico base em m/z 121 Da ($M^+ - 15$) (**Figura 14**), o que sugere um composto com fórmula molecular $C_{10}H_{16}$. O espectro do composto **3** se assemelha ao do monoterpene, **allo-Ocimeno**, que apresenta dois estereoisômeros (*E,Z*) e (*E,E*) (**neo-allo-Ocimeno**) cujos IK's são, respectivamente, 1132 e 1444 (ADAMS, 2007). Os dois compostos estão presentes nos voláteis com a presença da planta (ver Capítulo 2), no entanto, as respostas dos adultos de *C. ferruginea* foram obtidas frente ao tempo de retenção referente ao estereoisômero (*E,Z*) e, através das informações disponíveis na literatura consultada, foi possível confirmar a similaridade do espectro de massa do composto **3** com o espectro de massa desse estereoisômero.

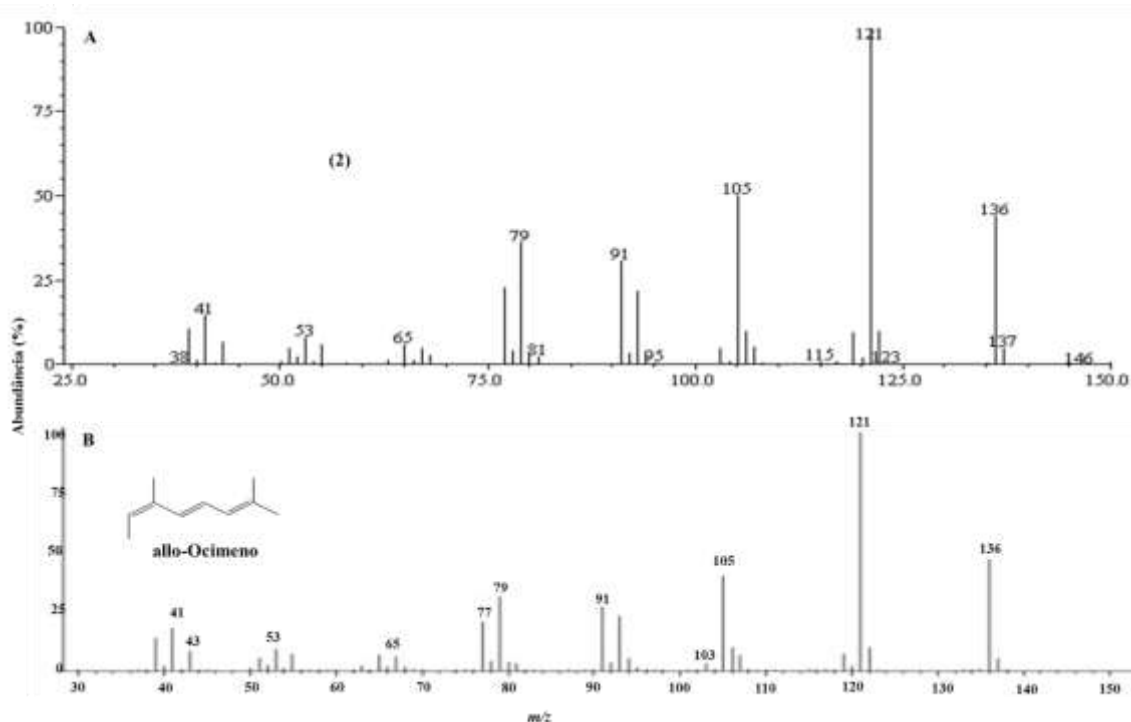


Figura 14. Espectro de massa referente ao composto **3** presente nas amostras com extratos de machos e fêmeas de *Costalimaita ferruginea* em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis*, ramos de eucalipto após alimentação dos besouros e de ramos de eucalipto sem ataque (A) e espectro de massa do estereoisômero (*E,Z*) do monoterpene, **allo-Ocimeno**, disponível na literatura (B) (fonte: El-Sayed, 2013).

3.3.4. Composto 4

O composto **4** foi constatado nos extratos de fêmeas sozinhas de *C. ferruginea*, de fêmeas em associação com o eucalipto e nos extratos obtidos dos ramos de eucalipto após alimentação dos besouros, e apenas fêmeas responderam a esses tratamentos. Dos 10 pares de antenas de fêmeas analisados frente ao tratamento F, cinco respostas foram observadas e, para aquelas amostras obtidas enquanto as fêmeas se alimentavam do eucalipto, a mesma resposta foi identificada em sete dos dez antenogramas. O mesmo estímulo também foi notado em um dos 10 antenogramas de fêmeas produzidos frente às amostras do tratamento EA. Neste caso, das duas amostras utilizadas nas análises, o composto só apareceu em uma. As concentrações do composto **4** presente nas duas amostras de cada tratamento utilizado para gerar os antenogramas se encontram na **Tabela 12**.

Tabela 12. Concentrações e respostas de adultos de *Costalimaita ferruginea* em relação ao composto **4** presente nas amostras de extratos de fêmeas, fêmeas em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* e de ramos de eucalipto após alimentação dos besouros. Viçosa/MG, 2012.

Voláteis	Amostra*	Concentração (ng μL^{-1})	Respostas observadas	
			Fêmeas	Machos
Fêmeas + eucalipto (F+E)	1	14,22	3,0	0,0
	2	16,59	4,0	0,0
Fêmeas (F)	1	8,78	2,0	0,0
	2	9,67	3,0	0,0
Eucalipto após alimentação dos besouros (EA)	1	2,47	0,0	0,0
	2	3,23	1,0	0,0

* Para cada amostra foram gerados cinco antenogramas por sexo.

Houve efeito entre os tratamentos em relação à concentração média ($F_{(2,12)}=5,19$; $p=0,024$) do composto **4**. Pelo teste Tukey, a concentração média do composto nas amostras do tratamento F+E ($12,23 \pm 1,83$ ng μL^{-1}) não difere da média das amostras do tratamento F ($8,78 \pm 1,68$ ng μL^{-1}), mas foi maior do que a concentração média do tratamento EA ($4,76 \pm 1,38$ ng μL^{-1}), que não diferiu da de fêmeas sozinhas (**Figura 15**).

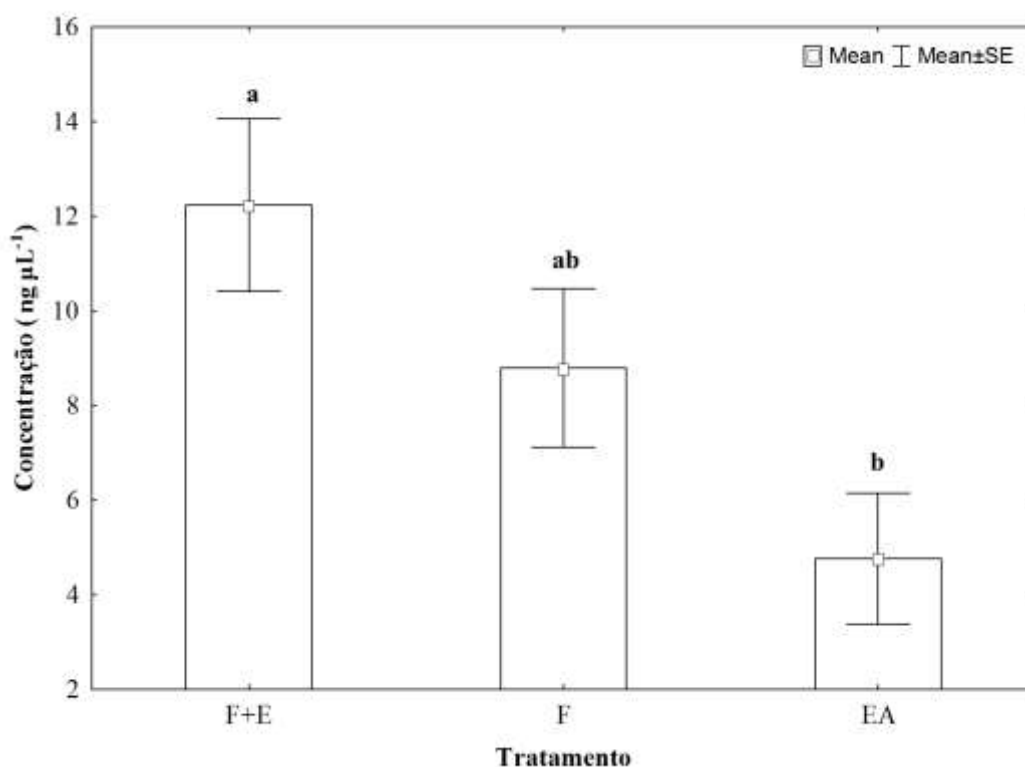


Figura 15. Concentração média \pm erro padrão do composto **4** presente nos tratamentos com fêmeas de *Costalimaita ferruginea* (F), fêmeas em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* (F+E) e de ramos de eucalipto após alimentação dos besouros (EA). (n=5) Colunas seguidas de letras distintas diferem significativamente (Tukey; $P<0,05$).

O Índice de Kovats (IK) observado para o composto bioativo **4** foi de 1208. Seu espectro de massa apresentou um pico do íon molecular (M^+) com valor de m/z 156 Da e um pico base em m/z 57 Da ($M^+ - 99$) (**Figura 16**), o que sugere um composto de fórmula

molecular $C_{10}H_{20}O$. As bibliotecas apontaram uma similaridade com o aldeído **Decanal**, que foi confirmada através de comparações do espectro de massa do composto **4** com o do aldeído, disponíveis na literatura (ADAMS, 2007; EL-SAYED, 2013) (**Figura 16**).

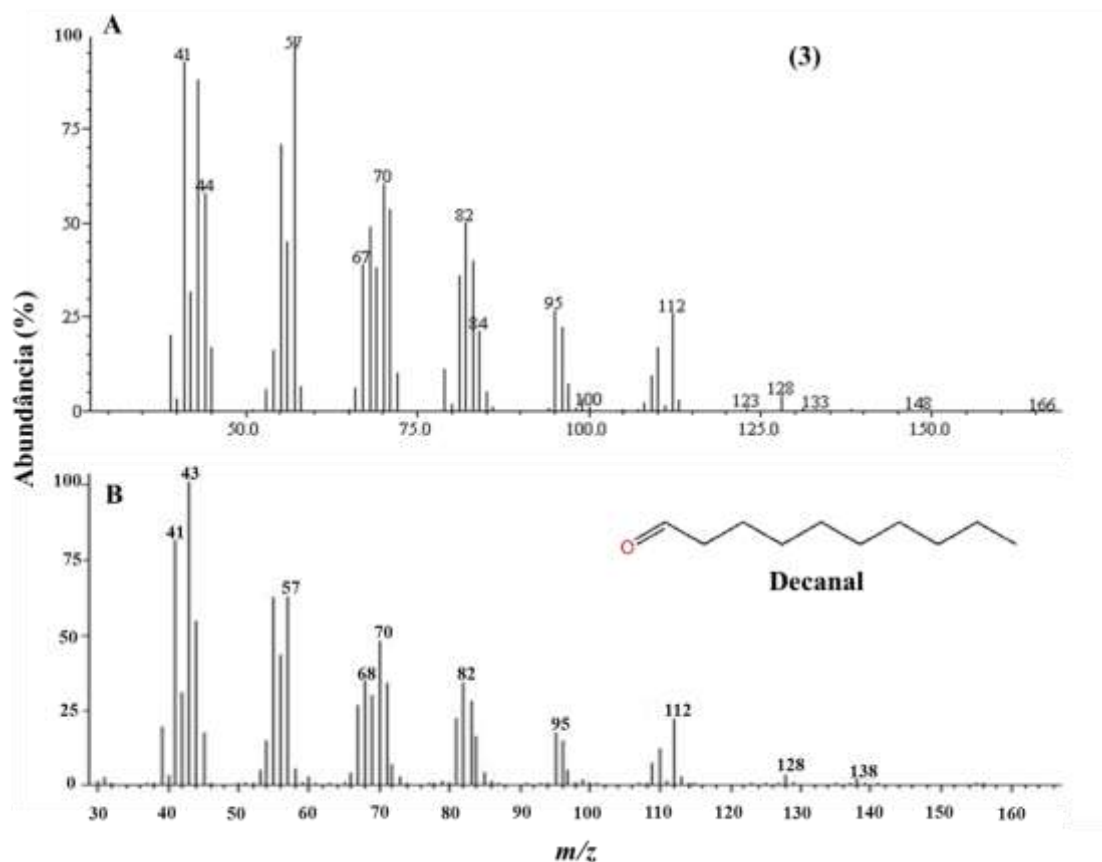


Figura 16. Espectro de massa do composto **4** presente nos extratos de fêmeas de *Costalimaita ferruginea*, fêmeas em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* e de ramos de eucalipto após alimentação dos besouros (**A**) e espectro de massa do aldeído, **Decanal**, disponível na literatura (**B**) (fonte: El-Sayed, 2013).

3.3.5. *Composto 5*

O composto **5** foi constatado em todos os voláteis obtidos de adultos de *C. ferruginea* e do eucalipto, mas uma possível atividade biológica só foi observada para os tratamentos com machos sozinhos e em associação com o eucalipto, fêmeas em associação com o eucalipto e eucalipto atacado. Dos 10 antenogramas de fêmeas e de machos frente às amostras do tratamento M+E, a resposta a esse composto foi identificada em oito e seis antenogramas, respectivamente. A concentração do composto nas amostras referentes a esse tratamento foi de 10,65 e 15,12 $ng \mu L^{-1}$ (**Tabela 13**). Nas amostras do tratamento M, três fêmeas e dois machos responderam ao composto e as suas concentrações foram de 2,50 e 2,68 $ng \mu L^{-1}$. Para o tratamento F+E a resposta foi identificada em apenas um antenograma de fêmea e em um de macho. No tratamento EA apenas uma resposta de fêmea foi detectada. Já para as amostras do tratamento F, nenhuma resposta foi observada

(Tabela 13). O composto 1 também foi encontrado em amostras do tratamento ES, mas respostas eletroantenográficas não foram geradas para esse tratamento.

Tabela 13. Concentrações e respostas de adultos de *Costalimaita ferruginea* em relação ao composto 5 presente nas amostras com extratos de machos, fêmeas, machos e fêmeas em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* e de ramos de eucalipto após alimentação dos besouros. Viçosa/MG, 2012.

Voláteis	Amostra*	Concentração (ng μL^{-1})	Respostas observadas	
			Fêmeas	Machos
Fêmeas + eucalipto (F+E)	1	0,32	0,0	0,0
	2	0,57	1,0	1,0
Machos + eucalipto (M+E)	1	10,65	4,0	3,0
	2	15,12	4,0	3,0
Fêmeas (F)	1	0,15	0,0	0,0
	2	0,00	0,0	0,0
Machos (M)	1	2,50	1,0	1,0
	2	2,68	2,0	1,0
Eucalipto após alimentação dos besouros (EA)	1	0,12	0,0	0,0
	2	0,39	1,0	0,0

* Para cada amostra foram gerados cinco antenogramas por sexo.

Houve efeito de tratamento em relação às concentrações dos tratamentos em que o composto 5 esteve presente ($F_{(5,24)}=23,87$; $p < 0,001$). A concentração média nas amostras do tratamento M+E ($19,10 \pm 3,76$ ng μL^{-1}) foi maior do que as demais. Já as concentrações médias do composto nos tratamentos F+E ($0,44 \pm 0,01$ ng μL^{-1}), M ($3,14 \pm 0,27$ ng μL^{-1}), F ($0,08 \pm 0,04$ ng μL^{-1}), EA ($0,29 \pm 0,08$ ng μL^{-1}) e ES ($0,33 \pm 0,07$ ng μL^{-1}) não diferiram significativamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (**Figura 17**).

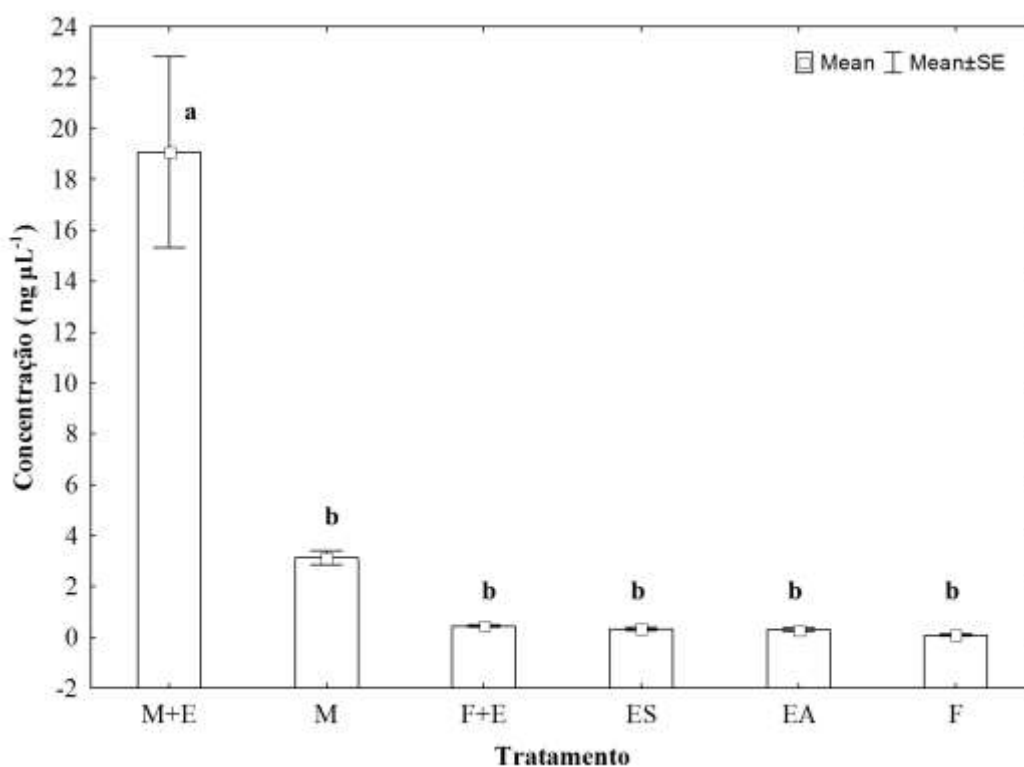


Figura 17. Concentração média \pm erro padrão do composto **5** presente nos tratamentos com fêmeas (F) e machos (M) de *Costalimaita ferruginea*, fêmeas (F+E) e machos (M+E) em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis*. (n=5), ramos de eucalipto após alimentação dos besouros (EA) e ramos sem ataque e sem insetos (ES). (n=5) Colunas seguidas de letras distintas diferem significativamente (Tukey; $P < 0,05$).

O IK observado para o composto bioativo **5** em coluna DB-5[®] foi de 1531. O espectro de massa apresentou um pico do íon molecular (M⁺) com valor de m/z 204 Da e um pico base em m/z 161 Da (M⁺ - 43) (**Figura 18**). De acordo com as indicações das bibliotecas e informações da literatura consultada, o espectro do composto **5** se assemelha ao do sesquiterpeno, γ -**Cadineno**, um composto de fórmula molecular C₁₅H₂₄ e cujo IK informado por Adams (2007) é de 1513.

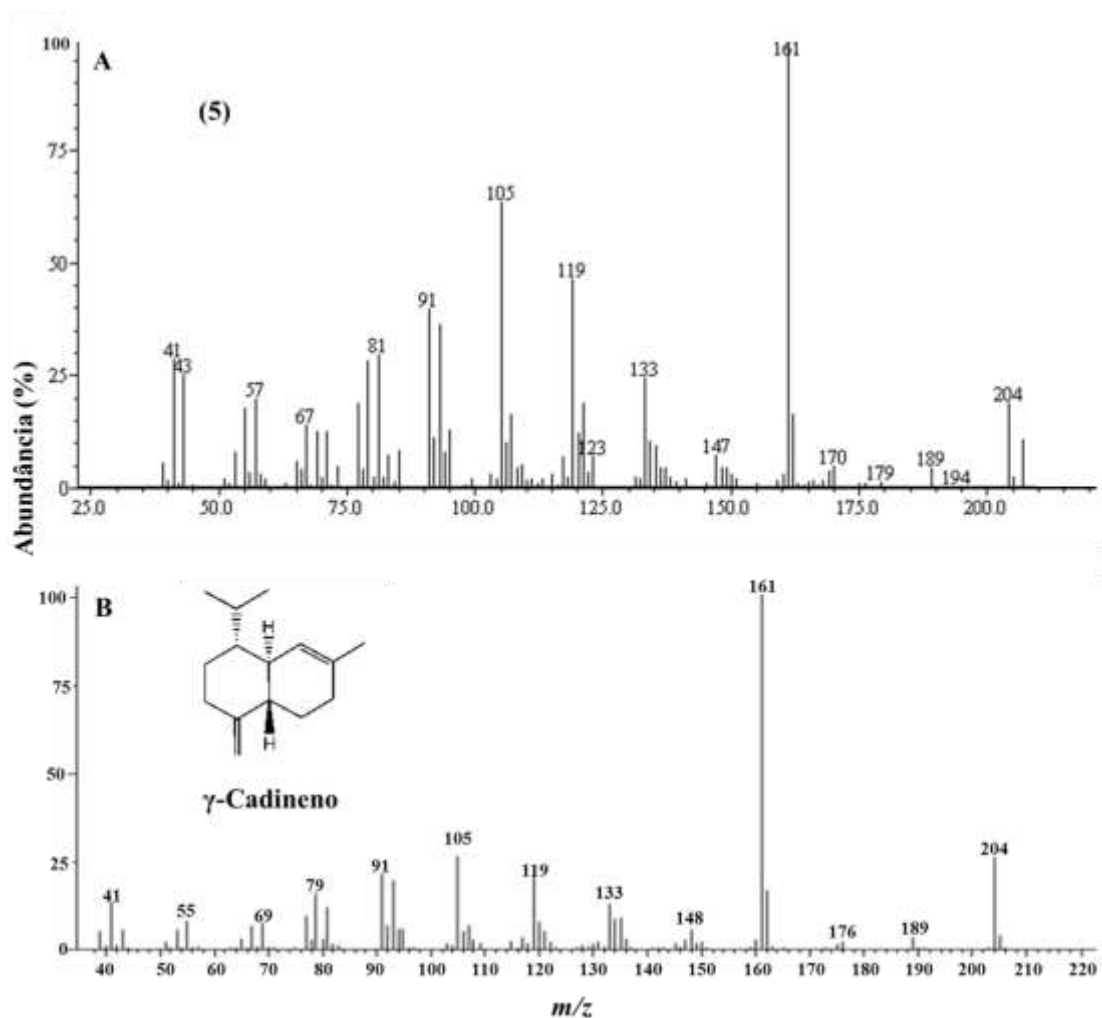


Figura 18. Espectros de massa referentes ao composto **5** presente nos extratos de machos e fêmeas de *Costalimaita ferruginea*, machos e fêmeas em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis*, ramos de eucalipto após alimentação dos insetos e de ramos sem ataque (**A**) e espectro de massa do sesquiterpeno, **γ -Cadineno**, disponível na literatura (**B**) (fonte: El-Sayed, 2013).

3.3.6. *Composto 6*

Para o composto **6**, as antenas de machos e fêmeas de *C. ferruginea* só responderam àquelas amostras de M e M+E e o composto só foi identificado nas amostras correspondentes a esses tratamentos. Para as amostras de M+E, três respostas de machos e duas de fêmeas foram observadas, já para as amostras do tratamento M cinco fêmeas e quatro machos responderam ao composto. As concentrações das amostras utilizadas para produzir as respostas eletroantenográficas e as respostas associadas a cada amostra por tratamento se encontram na **Tabela 14**.

Tabela 14. Concentrações e respostas de adultos de *Costalimaita ferruginea* em relação ao composto **6** presente nas amostras com extratos de machos e de machos em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis*. Viçosa/MG, 2012.

Voláteis	Amostra*	Concentração (ng μL^{-1})	Respostas observadas	
			Fêmeas	Machos
Machos + eucalipto (M+E)	1	4,20	2,0	3,0
	2	4,23	2,0	2,0
Machos (M)	1	1,25	2,0	2,0
	2	2,57	2,0	3,0

*Para cada amostra foram gerados cinco antenogramas por sexo.

Houve efeito de tratamento entre as concentrações médias do composto **6** para os extratos em que ele apareceu ($F_{(1,8)}=13,79$; $p=0,006$), logo a concentração no tratamento M+E ($4,93 \pm 0,47$ ng μL^{-1}) foi maior do que no tratamento M ($2,61 \pm 0,41$ ng μL^{-1}) (**Figura 19**).

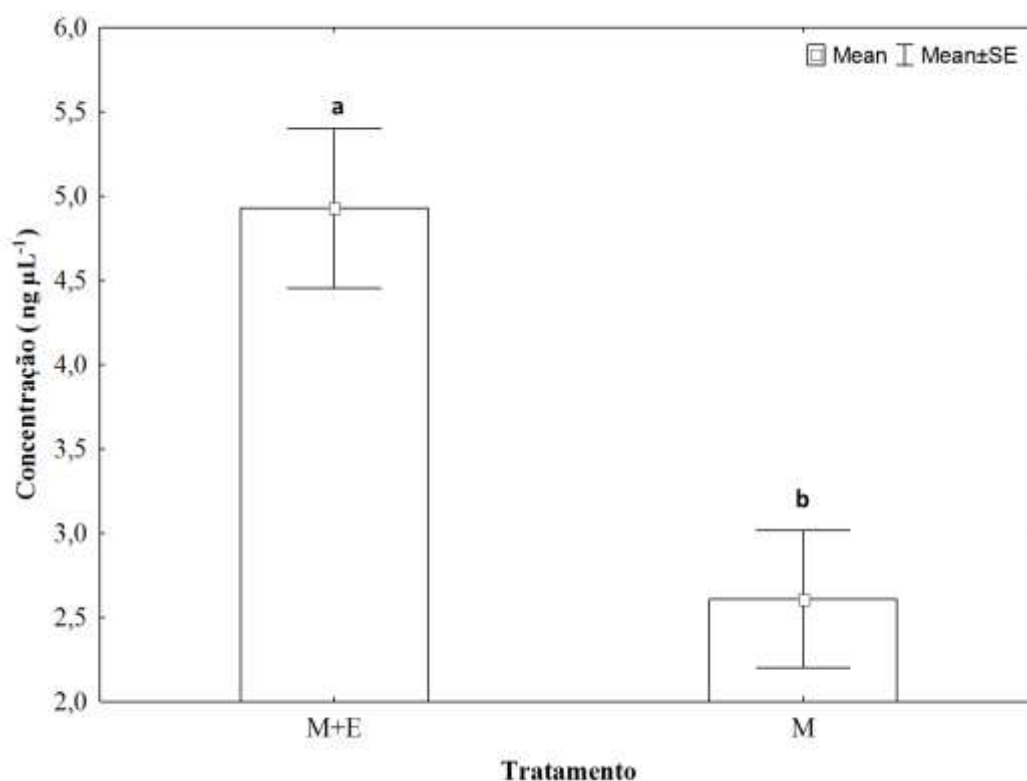


Figura 19. Concentração média \pm erro padrão do composto **6** presente nos tratamentos de machos de *Costalimaita ferruginea* (M) e de machos em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis* (M+E). (n=5) Colunas seguidas de letras distintas diferem significativamente (Tukey; $P<0,05$).

O composto **6** apresentou um IK igual a 1648 e também não foi possível encontrar na literatura uma referência para a determinação de seu perfil molecular, no entanto, seu espectro de massa apresentou um pico do íon molecular (M^+) com valor de m/z 204 Da e um pico base em m/z 105 Da ($M^+ - 99$) (**Figura 20**).

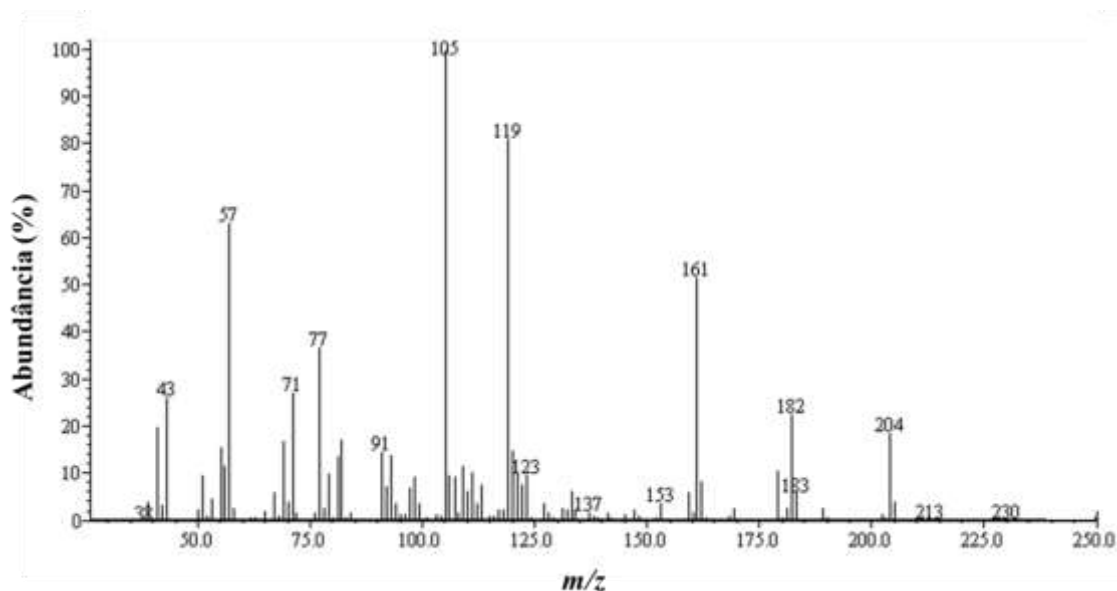


Figura 20. Espectro de massa referente ao composto **6** presente nos extratos de machos de *Costalimaita ferruginea* e desses em associação com ramos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* vs. *E. grandis*.

3.4. Discussão

Com base nos resultados apresentados pode-se observar um comportamento diversificado de adultos de *C. ferruginea* frente aos seis compostos que, de alguma forma, elicitaram uma resposta por parte das antenas submetidas ao detector eletroantenográfico, o que sugere funções biológicas diferenciadas. Alguns compostos foram exclusivos de certos sistemas, como o composto **6**, que parece ser específico de machos e que desencadeou uma resposta em fêmeas e machos, e os compostos **1** e **3**, que só ocorrem nos tratamentos com planta. Entretanto, a concentração do composto **1** aumentou consideravelmente quando os besouros foram inseridos no sistema, ao contrário do composto **3** em que a concentração não variou com a introdução de machos e fêmeas. Possivelmente os besouros utilizem esses compostos como pistas olfativas para a localização e/ou avaliação das condições do hospedeiro. Já outros, foram quase exclusivos, como os compostos **2** e **4**, que além de ocorrerem nos tratamentos com machos e fêmeas, respectivamente, também foram detectados nos voláteis da planta atacada. Temos também o composto **5** que ocorreu de forma generalizada em todos os sistemas, mas respostas foram observadas, quase exclusivamente, em tratamentos com machos (sozinhos ou em associação com a planta). Este composto e os compostos **2** e **6** são fortes candidatos na composição de um possível feromônio de agregação produzido por machos e que desencadeia respostas em ambos os sexos. Já o composto **4** parece ser um sinalizador sexual produzido por fêmeas e que afeta diretamente apenas fêmeas.

O **Acetato de (3Z)-Hexenila** é amplamente conhecido como um composto Volátil de Folha Verde (VFV), podendo agir, como atrativo para algumas espécies de insetos (VISSER & AVÉ, 1978), e como repelente para os outros, indicando, neste caso, a presença de hospedeiros inadequados (UNSICKER et al., 2009; ZHANG & SCHLYTER, 2004). Este composto já foi identificado em diversas espécies de plantas (GUERIN & VISSER, 1980; DEJONG & VISSER, 1988, BLIGHT et al., 1991; LANDON et al. 1997), inclusive em *Eucalyptus cordata* e *E. globulus* (BARATA et al. 2000; YUVARAJ et al. 2013). Landon et al. (1997) demonstraram que o **Acetato de (3Z)-Hexenila** foi o responsável pela atração de *Sitona lineatus* L. (Col.: Curculionidae), em olfatômetro, sendo este o composto responsável pela discriminação de sua planta hospedeira no campo. Este composto também é um dos principais VFV's liberados por espécies do gênero *Populus* (Salicaceae) após herbivoria (FROST et al., 2007) aumentando, assim, as concentrações de ácido jasmônico e ácido linoleico, com consequentes efeitos na produção de defesa direta e indireta da planta (FROST et al., 2008). Pode também atuar na atração de inimigos naturais de herbívoros, além de um importante papel na comunicação planta-planta, como sinalizador, para plantas vizinhas, da necessidade de produção de defesas (FROST et al. 2008; PIESIK et al. 2011; HIRAO et al. 2012). Ao investigarem a especificidade e sensibilidade dos neurônios sensoriais olfativos de *Ctenarytaina eucalypti* (Maskell, 1890) (Hem.: Psyllidae) aos diversos compostos voláteis liberados pelo gênero *Eucalyptus*, Yuvaraj et al. (2013) demonstraram uma resposta eletroantegráfica do pislídeo ao **Acetato de (3Z)-Hexenila**, mas uma função biológica associada à resposta não foi demonstrada. Por fim, este éster também já foi registrado como componente do feromônio de *Helopeltis theivora* (Waterhouse, 1886) (Hem.: Miridae) (SACHIN et al. 2008).

O **Acetato de (3Z)-Hexenila**, neste trabalho, foi detectado nos voláteis obtidos em todos os tratamentos com planta hospedeira (M+E, F+E, EA e ES). Com isso, pode-se sugerir que este composto seja emitido exclusivamente pelo eucalipto, corroborando os resultados dos estudos de Yuvaraj et al. (2013) e Barata et al. (2000), que o encontraram em voláteis de outras espécies de eucalipto. Não se pode afirmar se este composto atua como um repelente ou como um atrativo para o inseto. No entanto, uma vez que a emissão desse éster aumenta na presença dos besouros, pode ser que as defesas da planta sejam ativadas ou que ela esteja sinalizando para as vizinhas a presença de herbívoros. De qualquer forma, o besouro-amarelo parece ser capaz de perceber as alterações na concentração desse composto.

O monoterpreno, (*E,Z*) **allo-Ocimeno**, é caracterizado como um dos maiores componentes de óleo essencial extraído de várias espécies do gênero *Eucalyptus* (BATISH et al. 2008). Os óleos essenciais de eucalipto são conhecidos por sua atividade pesticida, consequência da presença de componentes tais como **Eucaliptol**, **Citronelal**, **Citronelol**, **Acetato de citronelila**, *p*-**Cymeno**, **Eucamalol**, **Limoneno**, **Linalool**, **α -Pineno**, **γ -Terpineno**, **α -Terpineol**, **allo-Ocimeno** e **Aromadendreno** (WATANABE et al., 1993; LI et al., 1995; 1996; CIMANGA et al., 2002, DUKE, 2004, BATISH et al., 2006, SU et al., 2006; LIU et al., 2008). No entanto, a bioatividade do óleo essencial depende do tipo e da natureza dos componentes e da sua concentração, e pode variar com a espécie, época, localização, clima, tipo de solo, idade das folhas, regime de fertilidade, método usado para a secagem do material vegetal, bem como com o método de extração do óleo (BROOKER & KLEINIG, 2006).

O composto (*E,Z*) **allo-Ocimeno** foi encontrado em todos os tratamentos com eucalipto (M+E, F+E, EA e ES) e, provavelmente, seja um composto exclusivo da planta, por não se ter detectado sua presença nos voláteis de machos e fêmeas sozinhos. No entanto, este composto foi percebido pelas antenas dos insetos, principalmente em concentrações maiores ou iguais a 3,82 ng μL^{-1} (Tabela 11). Apesar de não se ter encontrado diferenças entre as concentrações deste composto nos extratos dos tratamentos em que ele ocorre (Figura 13), a resposta do inseto parece depender da intensidade com que o composto foi emitido, como pode ser observado na (ver Tabela 3 do capítulo 2), cujos resultados apontam para uma tendência no aumento das respostas em relação ao aumento da concentração desses monoterpreno. A função biológica desse composto para o sistema inseto-planta permanece um mistério, e bio-ensaios que avaliem a atratividade e/ou repelência podem ajudar a esclarecer o real papel do **allo-Ocimeno** dentro desse sistema.

O aldeído, **Decanal**, é um composto orgânico muito conhecido por suas propriedades aromáticas, principalmente cítricas (HOGNADÓTTIR & ROUSEFF, 2003; CHISHOLM et al. 2003). Sua presença em feromônios de insetos já foi relatada para algumas espécies. Em *Hoplia equina* LeConte, 1880 (Col.: Scarabaeidae) é componente do feromônio sexual liberado pelas fêmeas (ZHANG et. al. 2003). É constituinte também do feromônio sexual emitido por machos, durante o comportamento de chamamento, em *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lep.: Pyralidae) (LEBEDEVA et al. 2002) e também serve de pista indireta de orientação ao potencial sítio de oviposição desse lepidóptero pelo parasitóide *Bracon hebetor* Say, 1857 (Hym.: Braconidae) (DWECK et al. 2010). O **Decanal** também foi detectado nos extratos de exúvias de ninfas machos e

fêmeas de *Thaumastocoridae peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hem.: Thaumastocoridae), conhecida por infestar plantações de eucaliptos em todo o Hemisfério Sul (MARTINS et al. 2012).

Nos extratos analisados neste trabalho, o **Decanal** não foi encontrado em tratamentos com machos do besouro-amarelo, o que sugere as fêmeas como emissor desse composto, se não fosse o fato de ele também ter sido detectado nas coleções de voláteis obtidas do eucalipto após ataque dos besouros, mesmo que em baixas concentrações (Figura 15). Possíveis explicações para esse fato estariam na permanência de traços do composto, após a retirada dos insetos, nas plantas atacadas, em quantidades suficientes para serem detectadas nas análises cromatográficas, ou então na produção desse composto a partir de alguma reação química entre voláteis presentes na planta atacada. De qualquer forma, percebe-se pelos resultados que este aldeído esteja atuando na comunicação entre fêmeas de *C. ferruginea*, possivelmente como um sinalizador sexual, pois além da resposta ter sido sexo-específica ela também parece ser dependente da intensidade de emissão do composto (Tabela 12). Mas o que a fêmea está querendo sinalizar? A qualidade do alimento, a saturação do ambiente, ou o seu status reprodutivo? Testes comportamentais devem ser conduzidos na tentativa de buscar respostas para essas questões.

Os dois compostos não identificados **2** e **6** são fortes candidatos para a composição de um feromônio de agregação liberado por machos de *C. ferruginea*. Eles aparecem quase exclusivamente em extratos com a presença de machos, com exceção do composto **2**, que também foi detectado em extratos da planta atacada em baixas concentrações quando comparado com o tratamento M+E. Provavelmente isso tenha ocorrido porque traços desse composto podem ter permanecido na planta atacada após a retirada dos insetos. Outra diferença é que a resposta ao composto **2** parece ser dependente da intensidade de emissão desse volátil (Tabela 10). Isso também sugere um forte sinergismo com a planta hospedeira. No escarabeídeo *Oryctes elegans* Prell, 1914, o principal componente do feromônio de agregação sozinho foi pouco atrativo, mas quando apresentado juntamente com o odor da planta hospedeira uma ação sinérgica foi claramente observada (ROCHAT et al., 2004). Em Crysomelidae esse efeito também foi demonstrado para algumas espécies, como aquelas do gênero *Phyllotreta* em que a captura de indivíduos no campo foi significativamente maior quando um atraente derivado da planta hospedeira foi adicionado aos componentes constituintes do feromônio de agregação produzido por machos das espécies analisadas (TÓTH et al., 2005; SOROKA et al. 2005). Casos similares de forte sinergismo entre componentes de feromônios e voláteis de planta

também já foram descritos para espécies do gênero *Rhynchophorus* (Col.: Curculionidae) e *Carpophilus* (Col.: Nitidulidae) (JAFFE et al. 1993; GIBLIN-DAVIS et al. 1994; OEHLSCHLAGER et al. 1995; ROCHAT et al. 1995; BARTELT 1999). Por outro lado, o composto **6** não parece apresentar essa dependência da concentração, pois mesmo que as concentrações tenham sido diferentes nas duas amostras (Figura 19), as respostas foram similares (Tabela 14).

O composto **5**, **γ -Cadineno**, já foi encontrado como constituinte de extrato de folhas de *Eucalyptus camaldulensis*, na composição de óleos essenciais de frutos de *E. globulus* e em acículas de *Pinus sylvestris* (KULA et al.1996; MACIAG et al. 2007; MEDHI et al. 2010; MULYANINGSIH et al. 2010; SZMIGIELSKI et al. 2012). Além disso, foi encontrado nas secreções de defesa em soldados de espécies de cupim do gênero *Reticulitermes* (BÀGNERES et al. 1990). Em Crisomelídeos é citado como um dos constituintes do feromônio de agregação emitido por machos de algumas espécies do gênero *Phyllotreta* e *Apthona* (PENG & WEISS, 1992; BARTELT et al. 2001; TÓTH et al. 2005).

O sesquiterpeno, **γ -Cadineno**, esteve presente em todos os tratamentos analisados (Tabela 13), sendo que a sua emissão foi significativamente maior no tratamento M+E. As respostas a este composto também parecem depender da intensidade de emissão desse sesquiterpeno, sendo que em concentrações menores que $0,39 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ a resposta não foi detectada, como demonstrado para as concentrações do composto nos tratamentos EA, F e F+E (Tabela 13). Este sesquiterpeno, assim como em outras espécies de eucalipto (ZINI et al., 2003), parece ser um constituinte do extrato de folhas de híbridos de *E. urophylla* vs. *E. grandis*, o que justificaria a sua presença nos tratamentos com a planta. No caso de fêmeas sozinhas, este composto pode ter sido liberado nas fezes em concentrações baixas, ressaltando que em uma das amostras desse tratamento o composto não foi identificado. Material fecal em algumas espécies de crisomelídeos apresenta um papel ecológico relevante servindo, muitas vezes, como pista para a agregação dos insetos (MULLER & HILKER, 2004). No entanto, a presença em machos sugere um possível componente de um feromônio de agregação liberado por machos cujos efeitos aumentam em associação com o eucalipto. É possível também que a produção e liberação desse composto sejam dependentes da presença de VFV's para que o composto possa ser ativo biologicamente, como ocorre em espécies do gênero *Melotontha* (Col.: Scarabeidae) (RUTHER et al. 2000; 2002; REINECKE et al, 2002a; 2002b). Tóth et al. (2005) verificaram que ao acrescentar o **Isotiocianato de alila**, um atraente derivado da planta hospedeira, na mistura feromonal de

machos de algumas espécies do gênero *Phyllotreta*, que também liberam o **γ -Cadineno** em sua mistura feromonal, as capturas em armadilha no campo foram significativamente maiores do que aquelas iscadas apenas com a mistura feromonal. Há também muitos coleópteros que são atraídos por misturas de VFV's que atuam como componentes de feromônios (REINECKE et al. 2002a; RUTHER & HILKER, 2003).

Os compostos que elicitaram alguma resposta neste estudo precisam ser testados em bioensaios comportamentais, para que se possa confirmar suas verdadeiras funções nos sistemas inseto-inseto e inseto-planta. A atratividade ou repelência desses compostos podem ser úteis no monitoramento e controle das populações de *C. ferruginea* no campo, como os compostos **Acetato de (3Z)-hexenila** e **allo-Ocimeno**. Já o sistema de comunicação química intraespecífico parece ser semelhante àquele observado para outras espécies de crisomelídeos, com a produção e a liberação de um feromônio de agregação produzido por machos e constituído por mais de um componente (BARTELT et al., 2001; ZILKOWSKI et al., 2006). Além disso, a ação dos componentes dos feromônios em alguns crisomelídeos é afetada pelos constituintes secundários produzidos pela planta hospedeira (TÓTH et al., 2005; SOROKA et al. 2005), o que parece ser o caso para alguns dos compostos observados para *C. ferruginea*.

CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho registrou pela primeira vez aspectos sobre as interações inseto-inseto e inseto-planta para *C. ferruginea* e o eucalipto, sua planta hospedeira.

A constituição dos voláteis emitidos pelo eucalipto seguiu um padrão já observado e relatado na literatura, tendo como constituinte majoritário o composto **Eucaliptol** e a presença representativa de outros terpenos.

Seis compostos voláteis foram percebidos pelas antenas de machos e fêmeas de *C. ferruginea* e evidências para um feromônio de agregação foram apresentadas.

O sistema de comunicação química intraespecífico parece ser semelhante àquele observado para outras espécies de crisomelídeos, com a produção e a liberação de um feromônio de agregação produzido por machos e constituído por mais de um componente.

Possíveis compostos liberados pelo eucalipto, atraentes e/ou repelentes, podem ser úteis no monitoramento e controle das populações de *C. ferruginea* no campo, como o composto **Acetato de (3Z)-hexenila** e **allo-Ocimeno**.

Os compostos que apresentaram alguma resposta neste estudo precisam ser testados em bioensaios comportamentais para identificar seus verdadeiros papéis nas interações inseto-inseto e inseto-planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF – **Anuário estatístico da ABRAF** (Associação Brasileira dos Produtores de Florestas Plantadas). www.abraflor.org.br, 2013. Disponível em: <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF13/ABRAF13_BR.pdf>. Acesso em junho de 2013.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007. 804 p.

AL-ALI, A.S.; AL-NEAMY, I.K.; ALWAN, M.S. On the biology and host preference of *Aulacophora foveicollis* Lucas (Coleoptera, Galerucidae). **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, 94(1-5): 82-86, 1982.

ANDREWS, E.S.; THEIS, N.; ADLER, L.S. Pollinator and herbivore attraction to cucurbita floral volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, 33:1682-1691, 2007.

ANJOS, N. **Taxonomia, ciclo de vida e dinâmica populacional de *Costalimaita ferruginea* (Fabr., 1801) (Coleoptera: Chrysomelidae), praga de *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae)**. 1992. 165 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo, 1992.

ANJOS, N.; MAJER, J.D. **Leaf-eating beetles in brazilian eucalypt plantations**. School of Environmental Biology. Perth: Curtin University of Technology, Bulletin n° 23, 33p. 2003.

ARAÚJO, F.O.L.; RIETZLER, A.C.; DUARTE, L.P.; SILVA, G.D.F.; CARAZZA, F.; VIEIRA FILHO, S.A. Constituintes químicos e efeito ecotoxicológico do óleo volátil de folhas de *Eucalyptus urograndis* (Mirtaceae). **Química Nova**, 33(7):1510-1513, 2010.

AZUMA, H.; THIEN, L.B.; TOYOTA, M.; ASAKAWA, Y.; KAWANO, S. Distribution and differential expression of (*E*)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene in leaf and floral volatiles of *Magnolia* and *Liriodendron* taxa. **Journal of Chemical Ecology**, 23:2467-2478, 1997.

BAGNÈRES, A.G.; CLÉMENT, J.L.; BLUM, M.S.; SEVERSON, R.F.; JOULIE, C.; LANGE, C. Cuticular hydrocarbons and defensive compounds of *Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *R. santonensis* (Feytaud): polymorphism and chemotaxonomy. **Journal of Chemical Ecology**, 16(12): 3213-3244, 1990.

- BALACHOWSKY, A.S. Les Phaedon. In: BALACHOWSKY, A.S. (Org.). **Entomologie appliquée à l'agriculture**. Paris: Masson, 1963. vol. 1, p. 749–753.
- BALL, H.J.; CHAUDHURY, M.F.B. A Sex attractant of the Western Corn Rootworm. **Journal of Economic Entomology**, 66(5):1051-1053, 1973.
- BARATA, E.N.; PICKETT, J.A.; WADHAMS, L.J.; WOODCOCK, C.M.; MUSTAPARTA, H. Identification of host and nonhost semiochemicals of eucalyptus woodborer *Phoracantha semipunctata* by gas chromatography electroantennography. **Journal of Chemical Ecology**, 26(8):1877-1895, 2000.
- BARTELT, R.J. Volatile hydrocarbon pheromone from beetles. In: BLOMQUIST, G. J.; BAYNÈRES, A. G. (Org.). **Insect hydrocarbons: biology, biochemistry and chemical ecology**. New York: Cambridge University Press, 2010. p. 448-476.
- BARTELT, R.J.; CHIANG, H.C. Field studies involving the sex-attractant pheromone of the Western and Northern Corn Rootworm Beetles. **Environmental Entomology**, 6(6): 853-861, 1977.
- BARTELT, R.J.; COSSÉ, A.A.; ZILKOWSKI, B.W.; WEISLEDER, D.; GRODE, S.H.; WIEDENMANN, R.N.; POST, S.L. Dimethylfuran-lactone pheromone from males of *Galerucella californiensis* and *G. pusilla*. **Journal of Chemical Ecology**, 32(3):693–712, 2006.
- BARTELT, R.J.; COSSÉ, A.A.; ZILKOWSKI, B.W.; WEISLEDER, D.; MOMANY, F.A. Male-specific sesquiterpenes from *Phyllotreta* and *Aphthona* flea beetles. **Journal of Chemical Ecology**, 27(12): 2397-2423, 2001.
- BARTELT, R.J.; COSSÉ, A.A.; ZILKOWSKI, B.W.; WIEDENMANN, R.N.; RAGHU, S. Early-summer pheromone biology of *Galerucella californiensis* and relationship to dispersal and colonization. **Biological Control**, 46: 409-416, 2008.
- BARTELT, R.J.; WEISLEDER, D.; MOMANY, F.A. Total Synthesis of himachalene sesquiterpenes of *Aphthona* and *Phyllotreta* flea beetles. **Synthesis**, 2003(1):0117-0123, 2003.
- BATISH, D.R.; SINGH, H.P.; KOHLI, K.R.; KAUR, S. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, 256:2166-2174, 2008.
- BATISH, D.R.; SINGH, H.P.; SETIA, N.; KAUR, S.; KOHLI, R.K. Chemical composition and phytotoxicity of volatile essential oils from intact and fallen leaves of *Eucalyptus citriodora*. **Zeitschrift für Naturforschung**, 61:465–471, 2006.
- BEDARD, W.D.; TILDEN, P.E.; WOOD, D.L.; SILVERSTEIN, R.M.; BROWNLEE, R.G.; RODIN, J.O. Western pine beetle: field responses to its sex pheromone and a synergistic host terpene myrcene. **Science**, 164:1284-1285, 1969.
- BERAN, F.; MEWIS, I.; SRINIVASAN, R.; SVOBODA, J.; VIAL, C.; MOSIMANN, H.; BOLAND, W.; BÜTTNER, C.; ULRICHS, C.; HANSSON, B.S.; REINECKE, A. Male *Phyllotreta striolata* (F.) produce an aggregation pheromone: identification of male-specific compounds and interaction with host plant volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, 37(1): 85-97, 2011.

- BERNASCONI, M.L.; TURLINGS, T.C.J.; AMBROSETTI, L.; BASSETTI, P.; DORN, S. Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid *Rhopalosiphum maidis*. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, 87(2):133-144, 1998.
- BLIGHT, M.; DAWSON, G.W.; PICKETT, J.A.; WADHAMS, L.J. The identification and biological activity of the aggregation pheromone of *Sitona lineatus*. **Aspects of Applied Biology**, 27:137-142, 1991.
- BLOMQUIST, G.J.; TILLMAN-WALL, J.A.; GUO, L.; QUILICI, D.R.; GU, P.; SCHAL, C. Hydrocarbon and hydrocarbon derived sex pheromones in insects: biochemistry and endocrine regulation. In: STANLEY-SAMUELSON, D.W.; NELSON, D. R. (Org.). **Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology**. Lincoln: University of Nebraska Press, 1996. p. 317–351.
- BORDEN, J.H. Aggregation pheromones. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Org.) **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. Elmsford: Pergamon Press, 1985. vol. 9. p. 257-285.
- BORIANI, M.; AGOSTI, M.; KISS, J.; EDWARDS, C.R. Sustainable management of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae), in infested areas: experiences in Italy, Hungary and the USA. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin**, 36(3): 531–537, 2006.
- BOUWER, M.C. **Identification of volatile organic compounds from *Eucalyptus* detected by *Gonipterus scutellatus* (Gyllehnal) females**. 2010. 200 f. Tese (Master of Science – Chemistry) – Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria, Pretoria, 2010.
- BRANSON, T.F.; GUSS, P.L.; KRYSAN, J.L. Winter populations of some *Diabrotica* in Central Mexico: voltinism and pheromone response. **Annals of the Entomological Society of America**, 71(2):165-166, 1978.
- BRANSON, T.F.; KRYSAN, J.L. Feeding and oviposition behavior and life cycle strategies of *Diabrotica*: an evolutionary view with implications for pest management. **Environmental Entomology**, 10(6):826-831, 1981.
- BROOKER, M.I.H.; KLEINIG, D.A. **Field Guide to Eucalyptus**. 3. ed. Melbourne: Bloomings Books, 2006. vol.1. 356 p.
- BROWN, E.S.; GREEN, A.H. The control by insecticides of *Brontispa longissima* (Gestro) (Coleopt., Chrysomelidae–Hispiinae) on young Coconut Palms in the British Solomon Islands. **Bulletin of Entomological Research**, 49(2):239-272, 1958.
- BRUCE, T.J.A.; WADHAMS, L.J.; WOODCOCK, C.M. Insect host location: a volatile situation. **Trends in Plant Science**, 10:269-274, 2005.
- BUTTERY, R.G.; LIGHT, D.M.; NAM, Y.; MERRIL, G.B.; ROITMAN, J.J. Volatile components of green walnut husks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48:2858-2861, 2000.
- CARDÉ, R.T.; BAKER, T.C. Sexual communication with pheromones. In: BELL, W.J.; CARDÉ R.T. (Org.). **Chemical ecology of insects**. London: Chapman & Hall, 1984. p. 355-381.

- CEULEMANS, R.J.; SAUGIER, B. Photosynthesis. In: RAGHAVENDRA, A.S. (Org.) **Physiology of Trees**. Hyderabad: John Wiley & Sons, 1991. p. 21-50.
- CHANDLER, L.D. Corn rootworm area wide management program: United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service. **Pest Management Science**, 59(6-7):605–608, 2003.
- CHIN, D.; BROWN, H. Biological control of palm leaf beetle, *Brontispa longissima* (Gestro) (Coleoptera: Chrysomelidae) with the wasp parasitoid, *Tetrastichus brontispae* (Ferriere) (Hymenoptera: Eulophidae) in Darwin. In: WORKSHOP FOR TROPICAL AGRICULTURAL ENTOMOLOGISTS, 6., 1998, Darwin. **Anais...** Darwin: Entomology Branch NT DPIF, 2001, p. 61-65.
- CHISHOLM, M.G.; WILSON, M.A.; GASKEY, G.M. Characterization of aroma volatiles in key lime essential oils (*Citrus aurantifolia* Swingle). **Flavour and Fragrance Journal**, 18: 106–115, 2003.
- CHUMAN, T.; GUSS, P.L.; DOOLITTLE, R.E., MCLAUGHLIN, J.R.; KRYSAN, J.L.; SCHALK, J.M.; TUMLINSON, J.H. Identification of female-produced sex pheromone from Banded Cucumber Beetle, *Diabrotica balteata* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Chemical Ecology**, 13(7):1601-1615, 1987.
- CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, 79:213-220, 2002.
- COSSÉ, A.A.; BARTELT, R.J.; ZILKOWSKI, B.W. Identification and electrophysiological activity of a novel hydroxy ketone emitted by male cereal leaf beetles. **Journal of Natural Products**, 65(8):1156-1160, 2002.
- COSSÉ, A.A.; BARTELT, R.J.; ZILKOWSKI, B.W.; BEAN, D.W.; PETROSKI, R.J. The aggregation pheromone of *Diorhabda elongate*, a biological control agent of Saltcedar (*Tamarix* spp.): identification of two behaviorally active components. **Journal of Chemical Ecology**, 31(3):657-670, 2005.
- COULSON, R.N.; WITTER, J.A. Concepts of integrated pest management. In: COULSON, R.N.; WITTER, J.A. (Org.). **Forest entomology ecology and management**. New York: John Wiley & Sons, 1984. p. 98-121.
- COURTOIS, E.A.; PAINE, C.E.; BLANDINIERES, P.A.; STIEN, D.; BESSIERE, J.-M.; HOUEL, E.; BARALOTO, C.; CHAVE, J. Diversity of the volatile organic compounds emitted by 55 species of tropical trees: a survey in French Guiana. **Journal of Chemical Ecology**, 35:1349-1362, 2009.
- CUTHBERT, F.P.; REID, W.J. Studies of sex attractant of Banded Cucumber Beetle. **Journal of Economic Entomology**, 57(2):247-250, 1964.
- DE MORAES, C.M.; LEWIS, W.J.; PARÉ, P.W.; ALBORN, H.T.; TUMLINSON, J.H. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. **Nature**, 393(6685):570-573, 1998.
- DE MORAES, C.M.; MESCHER, M.C.; TUMLINSON, J.H. Caterpillar induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. **Nature**, 410(6828):577-580, 2001.

DEJONG, R.; VISSER, J.H. Specificity-related suppression of responses to binary mixtures in olfactory receptors of the Colorado Potato Beetle. **Brain Research**, 447:18-24, 1988.

DELOACH, C. J.; CARRUTHERS, R.; DUDLEY, T.; EBERTS, D.; KAZMER, D.; KNUTSON, A.; BEAN, D.; KNIGHT, J.; LEWIS, P.; TRACY, J.; HERR, J.; ABBOT, G.; PRESTWICH, S.; ADAMS, G.; MITYAEV, I.; JASHENKO, R.; LI, B.; SOBHIAN, R.; KIRK, A.; ROBBINS, T.; DELFOSSE, E. First results for control of saltcedar (*Tamarix* spp.) in the open field in the western United States. In: SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS, 11., 2003, Canberra, Australia. **Anais...** Camberra: CSIRO Entomology, 2004. p. 505-513.

DEWILDE, J.; HILLE RIS LAMBERS-SUVERKROPP, K.; VAN TOL, A. Responses to airflow and airborne plant odour in the Colorado Beetle. **European Journal of Plant Pathology**, 75(1-2):53–57, 1969.

DICKENS, J.C. Green leaf volatiles enhance aggregation pheromone of boll weevil, *Anthonomus grandis*. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, 52:191-203, 1989.

DICKENS, J.C.; BILLINGS, R.F.; PAYNE, T.L. Green leaf volatiles interrupt aggregation pheromone response in bark infesting pines. **Experientia**, 48:523-524, 1992.

DICKENS, J.C.; JANG, E.B.; LIGHT, D.M.; ALFORD, A.R. Enhancement of insect pheromone responses by green leaf volatiles. **Naturwissenschaften**, 77(1):29-31, 1990.

DICKENS, J.C.; OLIVER, J.E.; HOLLISTER, B.; DAVIS, J.C.; KLUN, J.A. Breaking a paradigm: male-produced aggregation pheromone for the Colorado Potato Beetle. **Journal of Experimental Biology**, 205(13):1925–1933, 2002.

DOBLER, S.; DALOZE, D.; PASTEELS, J. M. Sequestration of plant compounds in a leaf beetle's defensive secretion: cardenolides in *Chrysochus*. **Chemoecology**, 8:111–118, 1998.

DOUGHTY, R.W. **The eucalyptus: a natural and commercial history of the Gum Tree**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2000. 237 p.

DUBIS, E.; MALINSKI, E.; DUBIS, A.; SZAFRANEK, J.; NAWROT, J.; POPLAWSKI, J.; WROBEL, J. T. Sex-dependent composition of cuticular hydrocarbons of the Colorado beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, 87(4):839–843, 1987.

DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D.A.; ORLOVA, I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 25:417- 440, 2006.

DUKE, J.A. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical databases. 2004. Disponível online em: <http://www.ars-grin.gov/duke>. Acesso em: 5 de junho, 2013.

DWECK, H.K.M.; SVENSSON, G.P.; GÜNDÜZ, E.A.; ANDERBRANT, O. Kairomonal response of the parasitoid, *Bracon hebetor* Say, to the male-produced sex pheromone of its host, the Greater Waxmoth, *Galleria mellonella* (L.). **Journal of Chemical Ecology**, 36:171-178, 2010.

ELAISSI, A.; MEDINI, H.; KHOUJA, M.L.; SIMMONDS, M.; LYNEN, F.; FARHAT, F.; CHEMLI, R.; HARZALLAH-SKHIRI, F. Variation in volatile leaf oils of five *Eucalyptus* species harvested from Jbel Abderrahman Arboreta (Tunisia). **Chemistry & Biodiversity**, 8:352-361, 2011a.

ELAISSI, A.; MEDINI, H.; SIMMONDS, M.; LYNEN, F.; FARHAT, F.; CHEMLI, R.; HARZALLAH-SKHIRI, F.; KHOUJA, M.L. Variation in volatile leaf oils of seven *Eucalyptus* species harvested from Zerniza Aboreta (Tunisia). **Chemistry & Biodiversity**, 8(2):362-372, 2011b.

EL-SAYED, A.M. The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals. 2013. Disponível em: <http://www.pherobase.com>. Acesso em: janeiro, 2013.

ENDERS, D.; JANDELEIT, B.; PROKOPENKO, O.F. Convergent synthesis of (*R,R*)-6,12-dimethylpentadecan-2-one, the female sex pheromone of the banded cucumber beetle by iron mediated chirality transfer. **Tetrahedron**, 51(22):6273-6284, 1995.

FERNANDEZ, P.; HILKER, M. Host plant location by Chrysomelidae. **Basic and Applied Ecology**, 8:97-116, 2007.

FROST, C.J.; APPEL, H.M.; CARLSON, J.E.; DE MORAES, C.M.; MESCHER, M.C.; SCHULTZ, J.C. Within-plant signaling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signaling and primes responses against herbivores. **Ecology Letters**, 10:490-498, 2007.

FROST, C.J.; MESCHER, M.C.; DERVINIS, C.; DAVIS, J.M.; CARLSON, J.E.; DE MORAES, C.M. Priming defense genes and metabolites in hybrid poplar by the green leaf volatile cis-3-hexenyl acetate. **New Phytologist**, 180(3):722-734, 2008.

FUKAYA, M.; YASUDA, T.; WAKAMURA, S.; HONDA, H. Reproductive biology of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotheta hilaris* (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae). III. Identification of contact sex pheromone on female body surface. **Journal of Chemical Ecology**, 22(2):259-270, 1996.

GASSEN, D.N. **Insetos subterrâneos prejudiciais às culturas no Sul do Brasil**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1989. 49 p. (EMBRAPA-CNPT. Documentos, 13).

GASSMANN, A.; SCHROEDER, D.; MAW, E.; SOMMER, G. Biology, ecology, and host specificity of European *Aphthona* spp. (Coleoptera, Chrysomelidae) used as biocontrol agents for leafy spurge, *Euphorbia esula* (Euphorbiaceae), in North America. **Biological Control**, 6: 105-113, 1996.

GEISELHARDT, S.; OTTE, T.; HILKER, M. The role of cuticular hydrocarbons in male mating behavior of the mustard leaf beetle, *Phaedon cochleariae* (F.). **Journal of Chemical Ecology**, 35(10):1162-1171, 2009b.

GEISELHARDT, S.F.; GEISELHARDT, S.; PESCHKE, K. Comparison of tarsal and cuticular chemistry in the leaf beetle *Gastrophysa viridula* (Coleoptera: Chrysomelidae) and an evaluation of solid-phase microextraction and solvent extraction techniques. **Chemoecology**, 19(4):185-193, 2009a.

- GIAMAKIS, A.; KRETSI, O.; CHINOU, I.; SPYROPOULOS, C.G. *Eucalyptus camaldulensis*: volatiles from immature flowers and high production of 1,8-cineole and β -pinene by *in vitro* cultures. **Phytochemistry**, 58:351-353, 2001.
- GIBLIN-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. **Florida Entomologist**, 77:164-177, 1994.
- GINZEL, M.D.; BLOMQUIST, G.J.; MILLAR, J.G.; HANKS, L.M. Role of contact pheromones in mate recognition in *Xylotrechus colonus*. **Journal of Chemical Ecology**, 29(3):533-545, 2003.
- GOLDEN, K.L.; MEINKE, L.J.; STANLEY-SAMUELSON, D.W. Cuticular hydrocarbon discrimination of *Diabrotica* sibling species. **Annals of the Entomological Society of America**, 85(5):561-570, 1992.
- GUERIN, P.M.; VISSER, J.H. Electroantennogram responses of carrot fly, *Psila rosae*, to volatile plant components. **Physiological Entomology**, 5: 111-119, 1980.
- GUSS, P.L. The sex pheromone of the Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera*). **Environmental Entomology**, 5(2):219-223, 1976.
- GUSS, P.L.; CARNEY, R.L.; SONNET, P.E.; TUMLINSON, J.H. Stereospecific sex attractant for *Diabrotica cristata* (Harris). **Environmental Entomology**, 12(4):1296-1297, 1983a.
- GUSS, P.L.; SONNET, P.E.; CARNEY, R.L.; BRANSON, T.F.; TUMLINSON, J.H. Response of *Diabrotica virgifera virgifera*, *D. v. zea*, and *D. porracea* to stereoisomers of 8-methyl-2-decyl propanoate. **Journal of Chemical Ecology**, 10(7):1123-1131, 1984.
- GUSS, P.L.; SONNET, P.E.; CARNEY, R.L.; TUMLINSON, J.H.; WILKIN, P.J. Response of northern corn rootworm, *Diabrotica barberi* Smith and Lawrence, to stereoisomers of 8-methyl-2-decyl propanoate. **Journal of Chemical Ecology**, 11(1):21-26, 1985.
- GUSS, P.L.; TUMLINSON, J.H.; SONNET, P.E.; MCLAUGHLIN, J.R. Identification of a female-produced sex pheromone from the southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber. **Journal of Chemical Ecology**, 9(9):1363-1375, 1983b.
- GUSS, P.L.; TUMLINSON, J.H.; SONNET, P.E.; PROVEAUX, A.T. Identification of a female-produced sex pheromone of the western corn rootworm. **Journal of Chemical Ecology**, 8(2):545-555, 1982.
- HAMMACK, L. Single and blended maize volatiles as attractants for Diabroticite Corn Rootworm Beetles. **Journal of Chemical Ecology**, 27(7):1373-1390, 2001.
- HAMMACK, L.; HIBBARD, B.E.; HOLYOKE, C.W.; KLINE, N.; LEVA, D.M. Behavioral response of Corn Rootworm adults to host plant volatiles perceived by Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Environmental Entomology**, 28(6):961-967, 1999.
- HAYNES, D.L.; GAGE, S.H. The cereal leaf beetle in North America. **Annual Review of Entomology**, 26:259-287, 1981.

- HELGESEN, R.G.; HAYNES, D.L. Population dynamics of the cereal leaf beetle, *Oulema melanopus* (Coleoptera: Chrysomelidae): a model for age specific mortality. **Canadian Entomologist**, 104:797-814, 1972.
- HIGHT, S.D.; BLOSSEY, B.; LAING, J.; DECLERCK-FLOATE, R. Establishment of insect biological control agents from Europe against *Lythrum salicaria* in North America. **Environmental Entomology**, 24(4):967–977, 1995.
- HIRAO, T.; OKAZAWA, A.; HARADA, K.; KOBAYASHI, A.; MURANAKA, T.; HIRATA, K. Green leaf volatiles enhance methyl jasmonate response in Arabidopsis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 114(5):540-545, 2012.
- HOGNADÓTTIR, A.; ROUSEFF, R.L. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography–olfactometry and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 998: 201–211, 2008.
- JAFFÉ, K.; SÁNCHEZ, P.; CERDA, H.; HERNÁNDEZ, J.V.; JAFFÉ, R.; URDANETA, N.; GUERRA, G.; MARTÍNEZ, R.; MIRAS, B. Chemical ecology of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): attraction to host plants and to a male-produced aggregation pheromone. **Journal of Chemical Ecology**, 19:1703-1720, 1993.
- JERMY, T.; BUTT, B.A. Method for screening female sex pheromone extracts of the Colorado Potato Beetle. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 59(1):75–78, 1991.
- JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E. Selection trophique et evolution chromosomique chez les Chrysomelinae (Coleoptera: Chrysomelidae). **Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia**, 66:59-60, 1976.
- JOLIVET, P.; SANTIAGO-BLAY, J.A.; SCHMITT, M. **Research on Chrysomelidae**. Netherlands: Brill Academic Publishers, 2009. 299 p.
- JOLIVET, P.; VERMA, K. K. **Biology of leaf beetles**. Andover: Intercept Publishers, 2002. 332 p.
- JOSEPH, T.C.; DEV, S. Studies in sesquiterpenes. XXXII. Structure of himachalene monohydrochloride and the preparation of *trans*-himachalenes. **Tetrahedron**, 24(10):3853–3859, 1968.
- KAWAZU, K.; ICHIKI, R.T.; DANG, D.T.; NAKAMURA, S. Mating sequence and evidence for the existence of a female contact sex pheromone in *Brontispa longissima* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Japan Agricultural Research Quarterly (JARQ)**, 45(1):99-106, 2011.
- KESSELMEIER, J.; STAUDT, M. Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. **Journal of Atmospheric Chemistry**, 33(1):23-88, 1999.
- KHALILOVA, A.Z.; PARAMONOV, E.A.; ODINOKOV, V.N.; KHALILOV, L.M. Identification and biological activity of volatile organic substances emitted by plants and insects. 1. Components of the native scents of *Leptinotarsa decemlineata* and *Solanum tuberosum*. **Chemistry of Natural Compounds**, 34:647-649, 1998.

- KHAN, V.A.; PENTEGOVA, V.A. Volatile components of the oleoresin of *Abies alba*. **Chemistry of Natural Compounds**, 24(2):162-166, 1988.
- KHAN, V.A.; TKACHEV, A.V.; PENTEGOVA, V.A. New sesquiterpenoids from the oleoresin of *Abies alba*. **Chemistry of Natural Compounds**, 24(5):606-611, 1988.
- KRYSAN, J.L. Introduction: biology, distribution, and identification of pest *Diabrotica*. In: KRYSAN, J. L.; MILLER T. A. (Org.). **Methods for the Study of Pest *Diabrotica***. New York: Springer-Verlag, 1986. p. 1-23.
- KRYSAN, J.L.; SMITH, R.F.; BRANSON, T.F.; GUSS, P.L. A New subspecies of *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae): description, distribution, and sexual compatibility. **Annals of the Entomological Society of America**, 73(2):123-130, 1980.
- KRYSAN, J.L.; WILKIN, P.H.; TUMLINSON, J.H.; SONNET, P.E.; CARNEY, R.L.; GUSS, P.L. Responses of *Diabrotica lemniscata* and *D. longicornis* (Coleoptera: Chrysomelidae) to stereoisomers of 8-methyl-2-decyl propanoate and studies on the pheromone of *D. longicornis*. **Annals of the Entomological Society of America**, 79(4):742-746, 1986.
- KUHAR, T.P.; MORI, K.; DICKENS, J.C. Potential of a synthetic aggregation pheromone for integrated pest management of Colorado Potato Beetle. **Agricultural and Forest Entomology**, 8(1):77-81, 2006.
- KULA, J.; MASARWEH, A.; GÓRA J. Main constituents of the sesquiterpene fraction of Polish turpentine. **Journal of Essential Oil Research**, 8:453-454, 1996.
- KUMAR, K.S.; NADARAJAN, L. Evidence of female-produced sex pheromone in red pumpkin beetle, *Aulacophora foveicollis* Lucas (Coleoptera: Chrysomelidae). **Current Science**, 94(11):1369-1371, 2008.
- LAMB, R.J. Entomology of oilseed *Brassica* crops. **Annual Review of Entomology**, 34:211-229, 1989.
- LANDON, F.; FERARY, S.; PIERRE, D.; AUGER, J.; BIEMONT, J. C.; LEVIEUX, J.; POUZAT, J. *Sitona lineatus* Host-plant odors and their components: effect on locomotor behavior and peripheral sensitivity variations. **Journal of Chemical Ecology**, 23(9):2161-2173, 1997.
- LEBEDEVA, K.V.; VENDILO, N.V.; PONOMAREV, V.L.; PLETNEV, V.A.; MITROSHIN, D.B. Identification of pheromone of the greater wax moth *Galleria mellonella* from the different regions of Russia. **IOBC-WPRS Bulletin**, 25:1-5, 2002.
- LEVINSON, H.Z.; LEVINSON, A.R.; JEN, T.L. Sex recognition by a pheromone in the Colorado beetle. **Naturwissenschaften**, 66(9):472-473, 1979.
- LI, H.; MADDEN, J.L.; POTTS, B.M. Variation in volatile leaf oils of the Tasmanian *Eucalyptus* species I. Subgenus Monocalyptus. **Biochemical Systematics and Ecology**, 23: 299-318, 1995.
- LI, H.; MADDEN, J.L.; POTTS, B.M. Variation in volatile leaf oils of the Tasmanian *Eucalyptus* species II. Subgenus Symphyomyrtus. **Biochemical Systematics and Ecology**, 24: 547-569, 1996.

- LIMA, A.M.C. **Insetos do Brasil**. 9º tomo. Coleópteros 3º parte. Seropédica: Escola Nacional de Agronomia, 1955. 289 p. (Série didática nº 11).
- LIU, X.; CHEN, Q.; WANG, Z.; XIE, L.; XU, Z. Allelopathic effects of essential oil from *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* on pathogenic fungi and pest insects. **Frontiers of Forestry in China**, 3: 232–236, 2008.
- LOUGHRIN, J.H.; MANUKIAN, A.; HEATH, R.R.; TURLINGS, T.C.J. Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivore-injured cotton plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, 91:11836-11840, 1994.
- LU, B.; TANG, C.; PENG, Z.; LA SALLE, J.; WAN, F. Biological assessment in quarantine of *Asecodes hispinarum* Bouček (Hymenoptera: Eulophidae) as an imported biological control agent of *Brontispa longissima* (Gestro) (Coleoptera: Hispididae) in Hainan, China. **Biological Control: Theory and Application in Pest Management**, 45(1):29–35, 2008.
- MACIAG, A.; MILAKOVIC, D.; CHRISTENSEN, H.H.; ANTOLOVIC, V.; KALEMBA, D. Essential oil composition and plant–insect relations in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Food Science and Biotechnology**, 71(1008): 71-95, 2007.
- MARICONI, F.A.M. Alguns besouros depredadores de eucaliptos na região de Piracicaba. **O Biológico**, 22:1-14, 1956.
- MARTEL, J.W.; ALFORD, A.R.; DICKENS, J.C. Laboratory and greenhouse evaluation of a synthetic host volatile attractant for Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **Agricultural and Forest Entomology**, 7:71-78, 2005.
- MARTINS, C.B.C.; SOLDI, R.A.; BARBOSA, L.R.; ALDRICH, J.R.; ZARBIN, P.H.G. Volatile chemicals of adults and nymphs of the eucalyptus pest, *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae). **Psyche**, 2012:1-6, 2012.
- MCINDOO, N.E. An insect olfactometer. **Journal of Economic Entomology**, 19:545–571, 1926.
- MCLAUGHLIN, J.R.; TUMLINSON, J.H.; MORI, K. Responses of male *Diabrotica balteata* (Coleoptera: Chrysomelidae) to stereoisomers of the sex pheromone 6,12-dimethylpentadecan-2-one. **Journal of Economic Entomology**, 84(1):99-102, 1991.
- MCLEOD, P.; DIAZ, F.J.; JOHNSON, D.T. Toxicity, persistence, and efficacy of Spinosad, Chlorfenapyr, and Thiamethoxam on eggplant when applied against the eggplant flea beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, 95(2):331–335, 2002.
- MEDHI, S.M.; REZA, S.; MAHNAZ, K.; REZA, A.M.; ABBAS, H.; FATEMEH, M.; HASSAN, V. Phytochemistry and larvicidal activity of *Eucalyptus camaldulensis* against malaria vector, *Anopheles stephensi*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 3(11):841-845, 2010.
- MENDES, J.E.P. **Efeitos do ataque de *Costalimaita ferruginea* (Fabr.) (Coleoptera: Chrysomelidae) sobre crescimento e produção de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden**. 2004. 49 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

- METCALF, R.L.; FERGUSON, J.E.; LAMPMAN, R.; ANDERSEN, J.F. Dry Cucurbitacin-containing baits for controlling diabroticite beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, 80(4):870-875, 1987.
- MORI, K. Synthesis of (*R*)-ar-turmerone and its conversion to (*R*)-ar-himachalene, a pheromone component of the flea beetle: (*R*)-ar-himachalene is dextrorotatory in hexane, while levorotatory in chloroform. **Tetrahedron: Asymmetry**, 16(3):685–692, 2005.
- MORRIS, B.D.; SMYTH, R.R.; FOSTER, S.P.; HOFFMANN, M.P.; ROELOFS, W.L.; FRANKE, S.; FRANCKE, W. Vittatalactone, a β -Lactone from the Striped Cucumber Beetle, *Acalymma vittatum*. **Journal of Natural Products**, 68(1):26-30, 2005.
- MORROW, P.A.; TONKYN, D.W.; GOLDBURG, R.J. Patch colonization by *Trirhabda canadensis* (Coleoptera: Chrysomelidae): effects of plant species composition and wind. **Oecologia**, 81:43-50, 1989.
- MULLER, C.; HILKER, M. Ecological relevance of fecal matter in Chrysomelidae. In.: JOLIVET, P.; SANTIAGO-BLAY, J.A.; SCHMITT, M. (Org.). **New developments in the biology of Chrysomelidae**. The Hague: SPB Academic Publishing, 2004. p. 693–705.
- MULYANINGSIHA, S.; SPORERA, F.; ZIMMERMANN, S.; REICHLINGA, J.; WINKA, M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine**, 17:1061-1066, 2010.
- MUSTAPARTA, H. Encoding of plant odour information in insects: peripheral and central mechanisms. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 104:1-13, 2002.
- MUTO, S.; BANDO, M.; MORI, K. Synthesis and stereochemistry of the four himachalene-type sesquiterpenes isolated from the Flea Beetle (*Aphthona flava*) as pheromone candidates. **European Journal of Organic Chemistry**, 2004(9):1946-1952, 2004.
- NARDI, C. **Estímulos olfativos envolvidos no comportamento sexual e na seleção hospedeira de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae)**. 2010. 105 f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2010.
- NELSON, D.R.; ADAMS, T.S.; FATLAND, C.L. Hydrocarbons in the surface wax of eggs and adults of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. **Comparative biochemistry and physiology Part B: Biochemistry molecular biology**, 134(3):447–466. 2003.
- NELSON, D.R.; CHARLET, L.D. Cuticular hydrocarbons of the sunflower beetle, *Zygogramma exclamationis*. **Comparative biochemistry and physiology Part B: Biochemistry molecular biology**, 135(2):273–284, 2003.
- NELSON, D.R.; OLSON, D.L.; FATLAND, C.L. Cuticular hydrocarbons of the flea beetles, *Aphthona lacertosa* and *Aphthona nigriscutis*, biocontrol agents for leafy spurge (*Euphorbia esula*). **Comparative biochemistry and physiology Part B: Biochemistry molecular biology**, 133(3):337–350, 2002.

- NICKAVAR, B.; KAMALINEJAD, M.; MOHANDESI, S. Comparison of the components of the essential oils from leaves and fruits of *Grammosciadium platycarpum*. **Chemistry of Natural Compounds**, 42(6):686-688, 2006.
- NICOLE, D.; DUNLOP, P.J.; BIGNELL, C.M. A study of the variation with time of the compositions of the essential leaf oils of 16 *Eucalyptus* species. **Flavour and Fragrance Journal**, 13:324–328, 1998.
- NIKOLOVA, N.; REZANKA, T.; NIKOLOVA-DAMYANOVA; B.; KALUSHKOV, P. Hydrocarbons in adult *Chrysomela vigintipunctata* (Scopoli) (Coleoptera: Chrysomelidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 123(1):67–77, 1999.
- NUNES, T.V; PIO, C.A. Emission of volatile organic compounds from Portuguese Eucalyptus Forests. **Chemosphere - Global Change Science**, 3(3):239–248, 2001.
- OEHLSCHLAGER, A.C.; PRIOR, R.N.B.; PEREZ, A.L.; GRIES, R.; GRIES, G.; PIERCE, H.D.; LAUP, S. Structure, chirality, and field testing of a male-produced aggregation pheromone of Asian Palm Weevil, *Rhynchophorus bilineatus* (Montr.) (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Chemical Ecology**, 21:1619-1629, 1995.
- OLIVER, J.E.; DICKENS, J.C.; GLASS, T.E. (*S*)-3,7-Dimethyl-2-oxo-6-octene-1,3-diol: an aggregation pheromone of the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **Tetrahedron Letters**, 43(14):2641–2643, 2002.
- PAGULA, P.F., BASER, K.H.C., KURKÇUOĞLU, M. Essential oil composition of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. from Mozambique. **Journal of Essential Oil Research**, 12:333–335, 2000.
- PANASIUK, O. Response of Colorado Potato Beetles, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), to volatile components of tansy, *Tanacetum vulgare*. **Journal of Chemical Ecology**, 10:1325-1333, 1984.
- PANDEY, R.C.; DEV, S. Studies in sesquiterpenes. XXX. Synthesis of *ar*-himachalene and himachalanes. **Tetrahedron**, 24(10):3829–3839, 1968.
- PARK, I.K.; LEE, S.G.; SHIN, S.C.; KIM, C.S.; AHN, Y.J. Feeding and attraction of *Agelastica coerulea* (Coleoptera: Chrysomelidae) to Betulaceae plants. **Journal of Economic Entomology**, 97:1978-1982, 2004.
- PENG, C.; BARTELT, R.J.; WEISS, M.J. Male crucifer flea produce an aggregation pheromone. **Physiological Entomology**, 24:98-99, 1999.
- PENG, C.; WEISS, M.J. Evidence of an aggregation pheromone in the flea beetle *Phyllotreta erueiferae* (Goeze) (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Chemical Ecology**, 18(6):875- 884, 1992.
- PERECIN, M.F. **Aspectos biológicos e técnica de criação de *Metallactus* sp. (Coleoptera: Chrysomelidae: Cryptocephalinae) em *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake.** 2003. 66 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2003.

- PETERSON, M.A.; DOUBLER, S.; HOLLAND, J.; TANTALO, L.; LOCKE, S. Behavioral, molecular, and morphological evidence for a hybrid zone between *Chrysochus auratus* and *C. cobaltinus* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Annals of the Entomological Society of America**, 94(1):1–9, 2001.
- PETERSON, M.A.; DOUBLER, S.; LARSON, E.L.; JUÁREZ, D.; SCHLARBAUM, T.; MONSEN, K.J.; FRANCKE, W. Profiles of cuticular hydrocarbons mediate male mate choice and sexual isolation between hybridizing *Chrysochus* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Chemoecology**, 17:87-96, 2007.
- PICHERSKY, E., GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, 5:237–243, 2002.
- PIESIK, D.; LEMŃCZYK, G.; SKOCZEK, A.; LAMPARSKI, R.; BOCIANOWSKI, J.; KOTWICA, K.; DELANEY, K.J. Fusarium infection in maize: volatile induction of infected and neighboring uninfected plants has the potential to attract a pest cereal leaf beetle, *Oulema melanopus*. **Journal of Plant Physiology**, 168:1534-1542, 2011.
- PORTER, J.W.; SPURGEON, S.L. **Biosynthesis of isoprenoid compounds**. New York: Wiley. 1981.
- PUTTICK, G.M.; MORROW, P.A.; LEQUESNE, P.W. *Trirhabda canadensis* (Coleoptera, Chrysomelidae) responses to plant odors. **Journal of Chemical Ecology**, 14:1671-1686, 1988.
- RAO, S.; COSSÉ, A.A.; ZILKOWSKI, B.W.; BARTELT, R.J. Aggregation pheromone of the cereal leaf beetle: field evaluation and emission from males in the laboratory. **Journal of Chemical Ecology**, 29(9):2165-2175, 2003.
- REDDY, G.V.P.; GUERRERO, A. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. **TRENDS in Plant Science**, 9(5):253-261, 2004.
- REINECKE, A.; RUTHER, J.; HILKER, M. The scent of food and defence: green leaf volatiles and toluquinone as sex attractant mediate mate finding in the European Cockchafer *Melolontha melolontha*. **Ecology Letters**, 5:257-263, 2002.
- REINECKE, A.; RUTHER, J.; TOLASCH, T.; FRANCKE, W.; HILKER, M. Alcoholism in cockchafers: orientation of male *Melolontha melolontha* towards green leaf alcohols. **Naturwissenschaften**, 89:265-269, 2002.
- ROCHAT, D.; AKAMOU, F.; SANGARE, A.; MARIAU, D.; MORI, K. Field trapping of *Rhynchophorus phoenicis* with stereoisomers of the synthetic aggregation pheromone. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, 318:183-190, 1995.
- ROCHAT, D.; MOHAMMADPOOR, K.; MALOSSE, C.; AVAND-FAGHIH, A.; LETTERE, M.; BEAUHAIRE, J.; PEZIER, A.; RENOU, M.; ABDOLLAHI, G. A. Male aggregation pheromone of date palm fruit stalk borer *Oryctes elegans*. **Journal of Chemical Ecology**, 30:387-407, 2004.
- RUTHER, J.; HILKER, M. Attraction of forest cockchafer *Melolontha hippocastani* to (Z)-3-hexen-1-ol and 1,4-benzoquinone: application aspects. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 107:141-147, 2003.

- RUTHER, J.; REINECKE, A.; HILKER, M. Plant volatiles in the sexual communication of *Melolontha hippocastani*: response towards time-dependent bouquets and novel function of (Z)-3-hexen-1-ol as a sexual kairomone. **Ecological Entomology**, 27:76–83, 2002.
- RUTHER, J.; REINECKE, A.; THIEMANN, K.; TOLASCH, T.; FRANCKE, W.; HILKER, M. Mate finding in the forest cockchafer, *Melolontha hippocastani*, mediated by volatiles from plants and females. **Physiological Entomology**, 25:172-179, 2000.
- SACHIN, J.P.; SELVASUNDARAM, R.; BABU, A.; MURALEEDHARAN, N. Behavioral and electroantennographic responses of the Tea Mosquito, *Helopeltis theivora*, to female sex pheromones. **Environmental Entomology**, 37(6):1416-1421. 2008.
- SANTOS, P.E.T.D.; GERALDI, I.O.; GARCIA, J.N. Estimates of genetic parameters of wood traits for sawn timber production in *Eucalyptus grandis*. **Genetics and Molecular Biology**, 27:567-573, 2004.
- SCHMIDT, Y.; BREIT, B. Enantioselective total synthesis and determination of absolute configuration of vittatalactone. **Organic Letters**, 11(21):4767-4769, 2009.
- SCHOONHOVEN, L.M.; JERMY, T.; VAN LOON, J.J.A. **Insect–plant biology: from physiology to evolution**. London: Chapman and Hall, 1998. 409 p.
- SCHWARZ, M.; JACOBSON, J.; CUTHBERT, F.P. Chemical studies of the sex attractant of the banded cucumber beetle. **Journal of Economic Entomology**, 64(3):769-770, 1971.
- SHEPERD, R.F. Management strategies for forest defoliators in British Columbia. **Forest Ecology and Management**, 68:303-304, 1994.
- SIMÕES, J.W.; BRANDI, R.M.; LEITE, N.B.; BALLONI, E.A. **Formação, manejo e exploração de florestas com espécies de rápido crescimento**. Brasília: IBDF, 1981. 131 p.
- SMYTH, R.R.; HOFFMANN, M.P. A male-produced aggregation pheromone facilitating *Acalymma vittatum* [F.] (Coleoptera: Chrysomelidae) early-season host plant colonization. **Journal of Insect Behavior**, 16(3):347-359, 2003.
- SOROKA, J.J.; BARTELT, R.J.; ZILKOWSKI, B.W.; COSSÉ, A.A. Responses of flea beetle *Phyllotreta cruciferae* to synthetic aggregation pheromone components and host plant volatiles in field trials. **Journal of Chemical Ecology**, 31(8):1829-1843, 2005.
- SOUZA, R.M. **Sinais envolvidos na comunicação de *Amerrhinus ynca* Sahlberg, 1823 (Coleoptera: Curculionidae)**. 2006. 120 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense “Darcy Ribeiro”, Campos dos Goytacazes, RJ, 2006.
- SOUZA, R.M.; ANJOS, N.; MAFIA, R.G.; BATISTA, T.R. Condições climáticas associadas com a ocorrência de *Costalimaita ferruginea* (Fabricius) em plantios de eucalipto. In: SIMPÓSIO DE MEIO AMBIENTE, 5., Viçosa, 2008. **Anais...** Viçosa, 2008. 1 CD-ROM.

- SPENCER, J.L.; HIBBARD, B.E.; MOESER, J.; ONSTAD, D.W. Behaviour and ecology of the western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). **Agricultural and Forest Entomology**, 11(1):9–27, 2009.
- SU, Y.C.; HO, C.L.; WANG, I.C.; CHANG, S.T. Antifungal activities and chemical compositions of essential oils from leaves of four eucalypts. **Taiwan Journal of Forest Science**, 21:49-61, 2006.
- SUGENO, W.; HORI, M.; MATSUDA, K. Identification of the contact sex pheromone of *Gastrophysa atrocyanea* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Applied Entomology and Zoology**, 41(2):269-276, 2006.
- SZMIGIELSKI, R.; CIESLAK, M.; RUDZIŃSKI, K.J.; MACIEJEWSKA, B. Identification of volatiles from *Pinus silvestris* attractive for *Monochamus galloprovincialis* using a SPME-GC/MS platform. **Environmental Science and Pollution Research**, 19:2860-2869, 2012.
- TANAKA, H.; SUZUKI, K. Expression profiling of a diapause-specific peptide (DSP) of the leaf beetle *Gastrophysa atrocyanea* and silencing of DSP by double-strand RNA. **Journal of Insect Physiology**, 51(6):701–707, 2005.
- TANSEY, J.A.; McCLAY, A.S.; COLE, D.E.; KEDDIE, B.A. Evidence for the influence of conspecific chemical cues on *Aphthona nigricutis* (Coleoptera: Chrysomelidae) behavior and distribution. **BioControl**, 50:343-358, 2005.
- TOLLEFSON, J.J. Rootworm areawide management program in Iowa. **Journal of Agricultural Entomology**, 15(4):351-357, 1998.
- TÓTH, M., CSONKA, E., BAKCSA, F., BENEDEK, P., SZARUKAN, I., GOMBOC, S., TOSHOVA, T., SUBCHEV, M.; UJVARY, I. Species spectrum of flea beetles (*Phyllotreta* spp., Coleoptera, Chrysomelidae) attracted to allyl isothiocyanate-baited traps. **Zeitschrift für Naturforschung**, 62:772-778, 2007.
- TÓTH, M.; CSONKA, E.; BARTELT, R.J.; COSSÉ, A.A.; ZILKOWSKI, B.W.; MUTO, S.; MORI, K. Pheromonal activity of compounds identified from male *Phyllotreta cruciferae*: field tests of racemic mixtures, pure enantiomers, and combinations with allyl isothiocyanate. **Journal of Chemical Ecology**, 31(11):1–16, 2005.
- TRIPLEHORN, C.A.; JOHNSON, N.F. **Estudo dos Insetos**. Tradução da 7. Edição de Borror and Delong's introduction to the study of insects. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 809p.
- UNSICKER, S.B.; KUNERT, G.; GERSHENZON, J. Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. **Current Opinion in Plant Biology** 12:479-485, 2009.
- VENTURA, M.U.; MELLO, E.P.; OLIVEIRA, A.R.M.; SIMONELLI, F.; MARQUES, F.A.; ZARBIN, P.H.G. Males are attracted by female traps: a new perspective for management of *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) using sexual pheromone. **Neotropical Entomology**, 30(3):361-364, 2001.

VISSER, J.H.; AVÉ, D.A. General green leaf volatiles in the olfactory orientation of the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 24: 538-549, 1978.

WAN, F. H.; HARRIS, P. Host finding and recognition by *Altica carduorum*, a defoliator of *Cirsium arvense*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 80:491–496, 1996.

WATANABE, K.; SHONO, Y.; KAKIMIZU, A.; OKADA, A.; MATSUO, N.; SATOH, A.; NISHIMURA, H. New mosquito repellent from *Eucalyptus camaldulensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 41:2164-2166, 1993.

WELLSO, S.G.; HOXIE, R.P. Biology of *Oulema*, In: JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T. H. (Org.). **Biology of Chrysomelidae**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 497–511.

WILCOX, J.A. **Coleopterorum Catalogus Supplementa. (Chrysomelidae: Galerucinae: Luperini: Aulacophorina, Diabroticina)**. 2. ed. Netherlands: Dr W. Junk, Dordrecht, 1972. fasc. 2. p. 296–431.

XU, X.; VAN STEE, L.L.P.; WILLIAMS, J.; BEENS, J.; ADAHCHOUR, M.; VREULS, R.J.J.; BRINKMAN, U.A.T.H.; LELIEVELD, J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) measurements of volatile organic compounds in the atmosphere. **Atmospheric Chemistry and Physics**, 3:665-682, 2003.

YUVARAJ, J.K.; ANDRESSON, M.N.; SETEINBAUER, M.J.; FARNIER K.; ANDERBRANT, O. Specificity and sensitivity of plant odor-detecting olfactory sensory neurons in *Ctenarytaina eucalypti* (Sternorrhyncha: Psyllidae). **Journal of insect Physiology**, 59:542-551, 2013.

ZAIKIN, V.G.; BORISOV, R.S. Chromatographic-mass spectrometric analysis of Fishcer-Tropsch synthesis products. **Journal of Analytical Chemistry**, 57(6):544-551, 2002.

ZAVALETA, E. The economic value of controlling an invasive shrub. **Ambio**, 29(8):462–467, 2000.

ZEBELO, S.A.; BERTEA, C.M.; BOSSI, S.; OCCHIPINTI, A.; GNAVI, G.; MAFFEI, M.E. *Chrysolina herbacea* modulates terpenoid biosynthesis of *Mentha aquatica* L. **Plos One**, 6(3):171-195, 2011.

ZHANG, A.; OLIVER, J.E.; CHAUHAN, K.; ZHAO, B.; XIA, L.; XU, Z. Evidence for contact sex recognition pheromone of the Asian Longhorned Beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). **Naturwissenschaften**, 90:410–413, 2003.

ZHANG, A.; ROBBINS, P.S.; AVERILL, A.L.; WEBER, D.C.; LINN J.R., D.C.; ROELOFS, W.L.; VILLANI, M.G. Identification of the female-produced sex pheromone of the scarab beetle, *Hoplia equina*. **Journal of Chemical Ecology**, 29(7):1635-1642, 2003.

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

ZILKOWSKI, B.W.; BARTELT, R.J.; COSSÉ, A.A.; PETROSKI, R.J. Male-produced aggregation pheromone compounds from the eggplant flea beetle (*Epitrix fuscata*): identification, synthesis, and field bioassays. **Journal of Chemical Ecology**, 32(11):2543–2558, 2006.

ZILKOWSKI, B.W.; BARTELT, R.J.; VERMILLION, K. Analysis of 2,4,6-Nonatrienal geometrical isomers from male flea beetles, *Epitrix hirtipennis* and *E. fuscata*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56(13): 4982–4986, 2008.

ZINI, C.A.; AUGUSTO, F.; CHRISTENSEN, E.; CARAMÃO, E.B.; PAWLISZYN, J. SPME applied to the study of volatile organic compounds emitted by three species of *Eucalyptus in situ*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50:7199-7205, 2002.

ZINI, C.A.; AUGUSTO, F.; CHRISTENSEN, E.; SMITH, B.P.; CARAMÃO, E.B.; PAWLISZYN, J. Monitoring biogenic volatile compounds emitted by *Eucalyptus citriodora* using SPME. **Analytical Chemistry**, 73(19):4729–4735, 2001.

ZINI, C.A.; ZANIN, K.D.; CHRISTENSEN, E.; CARAMÃO, E.B.; Solid-phase microextraction of volatile compounds from the chopped leaves of three species of *Eucalyptus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51:2679-2686, 2003a.

ZINI, C.A.; ASSIS, T.F.; LEDFORD, E.B.; DARIVA, C.; FACHEL, J.; CHRISTENSEN, E.; PAWLISZYN, J. Correlations between pulp properties of *Eucalyptus* clones and leaf volatiles using automated solid-phase microextraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 7848-7853, 2003b.