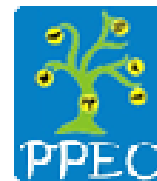




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E
CONSERVAÇÃO**

**COMPORTAMENTO DE CHAMAMENTO E EVIDÊNCIA DE
FEROMÔNIO SEXUAL EM *Atheloca subrufella* (HULST)
(LEPIDOPTERA: PHYCITIDAE)**

EDUARDO SILVA NASCIMENTO

MESTRADO ACADÊMICO

São Cristóvão
Sergipe – Brasil

2013

EDUARDO SILVA NASCIMENTO

**COMPORTAMENTO DE CHAMAMENTO E EVIDÊNCIA DE
FEROMÔNIO SEXUAL EM *Atheloca subrufella* (HULST)
(LEPIDOPTERA: PHYCITIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Bianca Giuliano Ambrogi

Co-Orientador: Dr. Adenir Vieira Teodoro

SÃO CRISTÓVÃO

SERGIPE – BRASIL

2013

N244c Nascimento, Eduardo Silva
Comportamento de chamamento e evidência de feromônio sexual em *Atheloca subrufella* (Hulst) (Lepidoptera: Phycitidae) / Eduardo Silva Nascimento ; orientadora Bianca Giuliano Ambrogi. – São Cristóvão, 2013.
41 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal de Sergipe, 2013.

1. Cocoicultura. 3. Traça-do-coqueiro. 4. Ecologia química. 5. Olfatometria. I. Ambrogi, Bianca Giuliano, orient. II. Título

CDU: 632.71/.79:634.616

TERMO DE APROVAÇÃO

COMPORTAMENTO DE CHAMAMENTO E EVIDÊNCIA DE FEROMÔNIO SEXUAL EM ATHELOCA SUBRUFELLA (LEPIDOPTERA: PHYCITIDAE)

por

EDUARDO SILVA NASCIMENTO

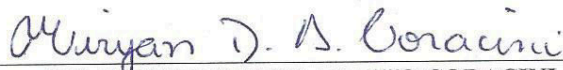
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Sergipe, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

APROVADA pela banca examinadora composta por



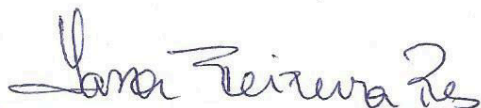
DR^a BIANCA GUILIANO AMBROGI

Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da
Universidade Federal de Sergipe



DR^a MIRYAN DENISE ARAUJO CORACINI

Universidade Federal do Paraná



DR^a YANA TEIXEIRA DOS REIS

Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão/SE, 29/07/2013

Agradecimentos

O fim de uma etapa chega, e com ele, vem a responsabilidade de sustentar dois anos de memórias e eternizá-los em poucas palavras. Por mais que me seja impossível traduzir o que vivenciei durante esse tempo, caio no clichê de que o fim de um ciclo tem por consequência o início de outro, e é assim que me sinto com essa conclusão de trabalho: pronto para começar algo maior. Se terminar um mestrado já é per se, algo difícil fazê-lo sozinho seria impossível, então, sinto-me na obrigação moral de agradecer aqui algumas das pessoas que tornaram as coisas menos difíceis.

À Larissa, que mais do que namorada, sempre foi minha maior cúmplice, companheira, parceira, confidente, motivadora, incentivadora e maior responsável por manter minha cabeça no lugar, me estimular e dizer que tudo ficariam bem quando as coisas não davam certo. Essa é Mestre, Doutora e PhD em me fazer feliz desde 2004. Saber que posso contar com ela é saber que estou seguro.

À minha mãe, Dona Maria, por aguentar e compreender a ausência, estresse e maluquice do filho, e mesmo sem entender direito o que eu fazia com “esses bichinhos”, em nenhum momento falhou com o papel de mãe, me apoiando e torcendo por mim em cada momento.

Ao meu pai, Seu Bené, e meus irmãos, Raphael e Felipe, que apesar da distância geográfica, nunca se afastaram na verdade e certamente se mantiveram na torcida. É bom saber que posso compartilhar desse orgulho com eles, pois sei o quanto torceram por mim.

À minha orientadora, Bianca Giuliano Ambrogi, sem a qual esse trabalho nunca teria sido feito. Agradeço não só a paciência e a compreensão com as minhas falhas, mas também toda a dedicação na minha orientação e atenção que só visaram engrandecer a minha formação como pesquisador. Do futuro, só espero poder honrar a confiança depositada e ser digno do título que carregarei de agora em diante.

Faço questão de registrar um agradecimento mais do que especial a Abel Queiroz, Jéssica Leite e Jucileide Santos, que deram o sangue e o suor para o desenvolvimento desse trabalho, que nunca teria tido sucesso se não fosse a constante ajuda deles. Em nenhum momento me abandonaram e sempre estiveram por perto quando precisei de ajuda, em campo, em coleta ou no laboratório. Mais do que colegas de laboratório, vejo-os praticamente como co-autores dessa dissertação.

Aos docentes do PPEC, pela imensurável contribuição ao conhecimento e crescimento de cada aluno. Agradeço ao Prof. Renato Faria e Marcelo Mendonça, pelas contribuições no

projeto de qualificação. Em especial, agradeço ao Prof. Leandro Sousa Souto pelas valiosíssimas contribuições fornecidas ao longo do trabalho, pois seja na parte da estatística ou na parte teórica, nunca se recusou a me ajudar quando precisei.

A todos os novos colegas e amigos que fiz nesse mestrado, em especial Arleu, Valter e Tacy, as gêmeas Amanda e Aline, Flávio e Danilo. O convívio, a amizade, as conversas, discussões, trabalhos, perrengues e dificuldades compartilhadas durante o tempo do curso são alguns dos bens mais valiosos que levarei carinhosamente comigo após o fim desse período.

A seu Pituca e Dona Eliana, pessoas boníssimas que nos permitiram fazer coletas em seu sítio, sempre foram amigáveis e prestativos conosco. Agradeço também as eventuais mangabas de queda que roubei.

A todos os funcionários da Universidade Federal de Sergipe, em especial a onipotente e onipresente Juliana Cordeiro, que nunca deixou ninguém na mão e sempre se dedicou a resolver os problemas dos outros com um bom humor invejável.

Agradeço a todos os amigos, e em especial os feitos na graduação, que continuaram firme remando nessa maré acadêmica. Sobre Marcelinho, Modesto, Izabel, Lari Trigueiros, Juninho, Halesio, Thomaz, Alex, Alana, Anna e Laila, afirmo: a amizade dessas pessoas, pra mim é mais importante do que qualquer título de bacharel.

Ao Laboratório de Entomologia e colegas, Rafaella, Arivânia, Brisa, David por tornarem o ambiente de trabalho um local mais divertido e aos professores José Dantas, Yana Teixeira e Ana Paula Marques, por todo o auxílio logístico, intelectual e acadêmico fornecido. As contribuições, ajudas e dicas recebidas ao longo de todos esses anos só me fizeram crescer.

Agradeço também a Thanany e Emmanoel pela ajuda essencial nas análises dos cromatogramas, bem como ao Dr. Adenir Teodoro e Jéssica Fontes pela colaboração nos experimentos com olfatômetro, na Embrapa.

Agradeço à FAPITEC/SE pela concessão da bolsa.

Agradeço por fim a todas as pessoas que colaboraram na execução desse projeto, direta ou indiretamente. Um sincero e enorme obrigado.

Sumário

Resumo	viii
Abstract	ix
1 - Introdução	1
2 - Objetivos	6
2.1 - Objetivo geral	6
2.2 - Objetivos específicos	6
3 - Hipóteses	7
4 - Material e Métodos	8
4.1 - Criação da traça-do-coqueiro	8
4.2 - Comportamento de chamamento	10
4.3 - Extração da glândula de feromônio	10
4.4 - Aeração dos voláteis	10
4.5 - Análise dos extratos de glândulas e os obtidos na aeração por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)	11
4.6 - Bioensaio em laboratório	12
4.7 - Análises estatísticas	13
5 - Resultados	14
5.1 - Comportamento de chamamento	14
5.2 - Análise dos extratos de glândulas	18
5.3 - Análise dos extratos obtidos pela aeração	18
5.4 - Bioensaios em olfatômetro em Y	19
6 - Discussão	20
7 - Considerações Finais	25
8 - Referências Bibliográficas	26

RESUMO

COMPORTAMENTO DE CHAMAMENTO E EVIDÊNCIA DE FEROMÔNIO SEXUAL EM *Atheloca subrufella* (HULST) (LEPIDOPTERA: PHYCITIDAE)

A traça-do-coqueiro, *Atheloca subrufella* (Hulst) (Lepidoptera: Phycitidae), é considerada uma importante praga na cultura do coco, principalmente na região nordeste do Brasil, que concentra mais de 70% da produção de cocos do país. Seu controle é difícil, pois sua lagarta se desenvolve no interior das flores e frutos do coqueiro, limitando a ação de agentes químicos. Com isso, a utilização de feromônio para manejo desse inseto se torna bastante promissora. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi verificar o comportamento de chamamento da traça-do-coqueiro, e determinar a função do feromônio sexual utilizado nesse processo. Foram avaliadas a posição de chamamento e o padrão e periodicidade da exibição desse comportamento. Os extratos foram obtidos de glândulas de feromônio de fêmeas virgens e a partir da aeração de machos e fêmeas. Os extratos foram analisados em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). A resposta comportamental de machos foi avaliada através de bioensaios utilizando um olfatômetro em Y. Através da análise do comportamento de chamamento, verificou-se que as fêmeas de *A. subrufella* possuem apenas uma posição de chamamento, e que esse comportamento tem um pico entre a segunda e quinta escotofases. A duração do chamamento e o número de chamadas não modificaram com o passar do tempo, no entanto, o início do chamamento foi antecipado nas fêmeas mais velhas, provavelmente para evitar competição com fêmeas mais novas. Os dados demonstraram que o melhor horário para realizar as extrações e testes comportamentais foi entre a 3^a e 7^a horas da terceira ou quarta escotofases. A partir da análise dos cromatogramas obtidos não foi possível verificar a presença de compostos feromonais da fêmea, o que foi corroborado com os resultados dos bioensaios, em que a resposta do macho não indicou a presença de feromônios sexuais. Sendo assim, se fazem necessários novos estudos para evidenciar a presença e elucidar a estrutura química de um possível feromônio sexual de *Atheloca subrufella*.

Palavras-chave: Traça-do-coqueiro, ecologia química, cocoicultura, olfatometria

ABSTRACT

CALLING BEHAVIOR AND EVIDENCE OF SEX PHEROMONE IN *Atheloca subrufella* (HULST) (LEPIDOPTERA: PHYCITIDAE)

The coconut moth, *Atheloca subrufella* (Hulst) (Lepidoptera: Phycitidae), is considered an important pest of coconut crop, especially in the Northeast of Brazil, which holds more than 70% of coconut production in the country. Its control is difficult because the caterpillars develop inside the flowers and fruits of the coconut palm, limiting the action of chemical agents. Thus, the use of pheromone for this insect management becomes quite promising. The objectives of this study were to describe the calling behavior of *A. subrufella* females and to verify the function of the pheromones involved in this process. The calling position, pattern and frequency of calling were evaluated. Female pheromone glands extracts were obtained and male and female volatiles were also collected by an aeration process, and were analyzed on a GC/MS to verify the presence of sex pheromones. The behavioral response of males was evaluated by bioassays using a Y-shaped-olfactometer containing a sample of female extracts. Analyzing the calling behavior, it was found that females of *A. subrufella* has only one calling position, and that this behavior has a peak between the second and fifth escotophases. Nor the duration of the calling or the number of calling bouts has changed over time, however, the beginning of the calling behavior was anticipated in older females, probably to avoid competition with younger females. Data showed that the best time to perform gland extractions and behavioral tests was between the third and seventh hour of the third or fourth escotophases. The chromatograms showed that it was not possible to demonstrate the presence of any female pheromonal compound, which was corroborated by the bioassays results, in which the male's response did not indicate the presence of any pheromone. Thus, further studies are needed to elucidate the chemical structure of *A. subrufella* sex pheromone.

Keywords: Coconut moth, chemical ecology, coconut crop, olfactometer.

1 - INTRODUÇÃO

A ecologia comportamental se desenvolveu com o objetivo de estudar os comportamentos inatos das diversas espécies, buscando responder questões como as causas imediatas de um determinado comportamento, como ele é desenvolvido, qual a sua função (seu valor de sobrevivência) e como ele se desenvolveu durante a evolução (Tinbergen 1951). O comportamento pode ser entendido como uma resposta dada por um organismo a determinados estímulos, estes estímulos podem ser externos, ambientais, ou internos, motivacionais (Scott 2005).

O comportamento está intimamente relacionado à sobrevivência do indivíduo e geralmente é flexível e ajustado às necessidades e ao ambiente de cada espécie. Logo, sofrem seleção natural, apresentando ampla variedade de possibilidades que partem de mecanismos mais simples em comum, o que também sugere ancestralidade entre estes. Uma vez que o comportamento é a resposta do indivíduo de determinada espécie a estímulos geralmente ambientais e sociais, o estudo do comportamento animal pode vir a responder questões ecológicas (Alcock 2011).

Parte integrante do comportamento animal é a comunicação, definida como um processo que envolve a transmissão de sinais entre organismos. Em algumas situações confere vantagens apenas para o organismo emissor e seu grupo; em outras, apenas para os organismos receptores ou para ambos (Nascimento & Sant'ana 2001). A comunicação animal pode ser de distintas formas, entre elas, a comunicação visual, tátil, sonora, e finalmente, a química (Scott 2005).

Os insetos são os seres vivos que mais utilizam a comunicação química para desempenhar suas funções vitais e comportamentais, e os odores são muito importantes na localização de presas, na defesa e na agressividade, na seleção de plantas hospedeiras, locais de oviposição, na corte, no acasalamento e na organização de suas atividades sociais assim como em diversos outros tipos de comportamentos (Vilela & Della Lucia 1987, Birch & Haynes 1982). A Ecologia Química nasce então da necessidade de se estudar essas substâncias químicas (também chamadas de semioquímicos) envolvidas nessas interações entre os organismos (Stiling 1996).

As substâncias químicas envolvidas na comunicação entre organismos da mesma espécie têm o nome de feromônios e podem ser definidas como substâncias secretadas por um indivíduo e recebidas por um segundo, provocando uma reação específica ou um processo de desenvolvimento fisiológico específico (Karlson & Lüscher 1959).

Os feromônios são compostos químicos produzidos em glândulas especializadas, e podem ser de dois tipos, quanto ao tempo de ação: os preparadores, que têm ação lenta e prolongada, ou os desencadeadores, que quando liberados pelo organismo induzem respostas de ação imediata. Segundo Harbone (1993), quanto à função, os principais feromônios são: de agregação, que tem como principal função atrair um grande número de indivíduos; feromônios de oviposição, que se relacionam a localização adequada para a fêmea fazer a postura de ovos; feromônios de alarme; em que é transmitida uma mensagem indicando a presença de um inimigo; feromônios de trilha, comuns nos insetos sociais e utilizados para localização da colônia, fonte de alimento, entre outros; feromônios de marcação, para delimitar territórios; e finalmente os feromônios sexuais, que aumentam a probabilidade de sucesso no acasalamento, podendo ser produzido por machos ou fêmeas, dependendo da espécie. Esses feromônios desencadeiam certas respostas, como orientação, comportamento pré-copulatório e acasalamento em outro indivíduo da mesma espécie (Roelofs & Cardé 1977).

O papel dos feromônios no comportamento reprodutivo de lepidópteros noturnos está bem estabelecido. Na maioria das espécies, as fêmeas emitem e os machos respondem a uma combinação de substâncias voláteis, denominada feromônio sexual (Roelofs & Cardé 1977, Tamaki 1985). Algumas espécies de mariposas mantêm o isolamento reprodutivo através de diferenças químicas em seus feromônios sexuais, quando na ausência de outros meios como o isolamento geográfico, sazonal ou temporal (Roelofs & Cardé 1974, Greenfield & Karandinos 1979).

O acasalamento das mariposas geralmente depende da expressão de uma série de padrões comportamentais (Hou & Sheng 2000). Nas fêmeas, esses comportamentos incluem a produção de feromônios sexuais voláteis e emissão desses compostos por comportamento de chamamento, que por sua vez desencadeia uma série de comportamentos pré-copulatórios nos machos, que envolvem desde a sua percepção, atração até a localização da fêmea para posterior cópula (Kingan et al. 1993, Linn & Roelofs 1989).

O estudo do comportamento de chamamento vem sendo utilizado para se conhecer melhor a bioecologia e reprodução de diversos insetos, já que dependem e são influenciadas por vários fatores, como idade da fêmea e do macho, luminosidade, temperatura, entre outros (Lima et al. 2008, Curkovic & Ferrera 2012). Além disso, o comportamento de chamamento pode servir como uma medida indireta do padrão de produção de feromônios sexuais.

Nos lepidópteros, os fatores comportamentais envolvidos na reprodução são coordenados temporalmente e, dessa forma ocorrem sincronicamente sob condições

favoráveis em ambientes heterogêneos (Webster & Cardé 1982). Ritmos diários do comportamento reprodutivo, tais como chamamento e liberação de feromônio, são geralmente endógenos e suas expressões e momentos de ocorrência são, geralmente, alterados por fatores exógenos, principalmente fotoperíodo e temperatura (Sower et al. 1971, Castrovillo & Cardé 1979, West et al. 1984).

O comportamento de chamamento é associado a otimização da emissão dos feromônios sexuais pelas fêmeas a partir de posições características, sendo mais fácil para os machos localizarem as fêmeas e aumentar o sucesso reprodutivo (West & Bowers 1994). Um comportamento de chamamento bastante comum entre as fêmeas de lepidópteros noturnos é, por exemplo, a projeção do abdômen entre as asas, com os segmentos distais perpendiculares ao corpo, exposição da glândula e constante antenação, como descrito para *Amyeloides transitella* (Pyralidae) (Parra-Pedrazzoli & Leal 2006) e para *Phyllonorycter emberizaepenella* (Gracillariidae) (Mozuraitis et al. 2002).

Os lepidópteros compreendem a segunda maior ordem de hexápodes, com aproximadamente 120.000 espécies descritas em todo o mundo, das quais aproximadamente 26.000 ocorrem no Brasil (Brusca & Brusca 2007).

Os hábitos dos lepidópteros podem estar relacionados a diversas situações que remetem ao equilíbrio ecológico e a maioria desses insetos mantêm uma interação com as plantas, as quais oferecem alimento, e em troca atuam como potenciais polinizadores, auxiliando e permitindo o fluxo gênico entre as populações e garantindo a estabilidade das comunidades vegetais (Fonseca et al. 2006).

Devido alguns atributos de sua ecologia, alguns lepidópteros são considerados pragas agrícolas, já que sua fase larval é mastigadora e pode causar problemas às plantas, seja raspando a epiderme do fruto, atacando folíolos, formando galerias em folhas de diversas culturas (Botton et al. 2003, Kovaleski et al. 1998, Carvalho 1982).

A traça-do-coqueiro *Atheloca subrufella* (Hulst 1887) (Lepidoptera: Phycitidae) é considerada uma praga importante de coco (*Cocos nucifera*) no Brasil (Ferreira et al. 2002a). No entanto apesar de sua ampla distribuição no Brasil, a importância desse inseto varia de acordo com a região, com as condições climáticas e, principalmente, com as técnicas de manejo adotadas na condução da cultura (Ferreira et al. 2002b).

O primeiro relato dessa espécie como praga no Brasil foi feito por Bondar (1940) na Bahia e em Pernambuco. Posteriormente, com a expansão da cultura, constatou-se sua ocorrência em todos os estados do Nordeste (Ferreira et al. 2002a). Ela também ocorre no sul

dos Estados Unidos, norte do México, Cuba e nas Ilhas Virgens Americanas (Habeck & Nickerson 1982, Hodges et al. 1983, Heinrich 1956, Moore 2001).

Embora ocorram danos significativos em diferentes regiões, as poucas informações existentes sobre *A. subrufella* são restritas geralmente à sua distribuição e aspectos bioecológicos, como exigências térmicas, duração dos estágios de ovo, lagarta e pupa, número de instares larvais, proporção sexual, longevidade e taxa de fecundidade dos adultos, bem como seu comportamento de acasalamento (Santana et al. 2010, Bento et al. 2006). O adulto da traça-do-coqueiro é uma mariposa pequena, com asas de cor pardacenta de 1,4 a 1,8 cm de envergadura. Durante o dia, os adultos ficam abrigados sob as espatas abertas da inflorescência do coqueiro. As lagartas recém-eclodidas são brancas, pigmentadas no dorso, com listras longitudinais pardacentas ou rosadas (Ferreira et al. 2009, Santana et al. 2011). Assim que a inflorescência abre, a mariposa deposita seus ovos (Moura & Vilela 1998), que se desenvolvem nas inflorescências após a deiscência da espata, perfurando a epiderme das flores e, se a flor já tiver sido fertilizada, entram no fruto em desenvolvimento, broqueando o mesocarpo (Bondar 1940, Ferreira et al. 2002c). Além do coqueiro, outras palmeiras do gênero *Attalea* e *Syagrus* são hospedeiras de *A. subrufella* (Ferreira et al. 2002c).

As lagartas constroem galerias em várias direções e seu ataque é caracterizado pela presença de grânulos fecais aglomerados e unidos por fios de seda na abertura das galerias (Moura & Vilela 1998) (Figura 01). Os frutos que resistem ao ataque da traça, chegando à maturação, podem ficar deformados tendo seu valor comercial depreciado (Ferreira et al. 1997).



Figura 01: Adulto e lagartas de *Atheloca subrufella* e danos causados ao coco. Grânulos fecais aglomerados e unidos por fios de seda na abertura das galerias caracterizando a presença das lagartas no fruto.

O controle da traça-do-coqueiro é particularmente difícil devido ao constante desenvolvimento das inflorescências e ao seu comportamento endofítico, e tem sido feito por meio de catação manual e destruição de frutos abortados caídos no chão e dos secos presos às inflorescências, bem como o uso de inseticidas de contato (Moura & Vilela 1998). Adicionalmente aos problemas ambientais e à saúde das pessoas, o controle químico com pesticidas causa surtos de pragas primárias e secundárias, seleção de populações resistentes e mortalidade de inimigos naturais de pragas, e é pouco eficaz, já que as lagartas costumam ficar protegidas sob as brácteas do coco (Gallo et al. 2002, Geiger et al. 2010, Bento et al. 2006).

A cocoicultura é uma das atividades econômicas mais importantes do Brasil, sendo o coqueiro uma das mais importantes frutíferas cultivadas no país. A região Nordeste é responsável por 73% da produção nacional de coco, proporcionando emprego e renda para mais de 220 mil produtores. Em 2011, a área colhida no país atingiu 261.824 ha (IBGE 2012), gerando 1,89 milhões de toneladas e posicionando o Brasil como o quarto maior produtor mundial de coco. Em Sergipe, apesar da grande área colhida (45.720 ha) a produção de frutos é considerada relativamente baixa, com média de 91,985 milhões de cocos (Aragão et al. 1997, Agriannual 2003).

Desse modo, os feromônios sexuais representam uma alternativa com maiores perspectivas para auxiliar e otimizar de forma racional o uso dos métodos de controle de lepidópteros, além de causarem baixo impacto ao ecossistema (Corrêa & Sant' Ana 2001). Além disso, o uso dos feromônios como forma alternativa no manejo de pragas proporciona vantagens como: metodologia simples, economia e um menor impacto ambiental (Ghini & Bettiol 2000). Para tal, é necessário uma série de estudos que compreende a verificação da existência da comunicação química em populações naturais, até a identificação, síntese e testes dos componentes do feromônio (Lingren et al. 1980). O uso de feromônios sexuais vem sendo utilizados também para o acompanhamento da dinâmica, da densidade e da flutuação populacional de insetos (Wall 1990, Morandi Filho et al. 2007) e os dados obtidos com esses estudos fornecem base para a melhor compreensão da biologia do inseto, bem como ciclo de vida e época de maior incidência, o que pode auxiliar projetos futuros.

2 - OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Verificar o comportamento de chamamento da traça-do-coqueiro *Atheloca subrufella* e determinar a função dos feromônios utilizados nesse processo.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o comportamento de chamamento e sua relação com a idade das fêmeas;
- Conferir a atratividade do macho aos extratos das glândulas de feromônio das fêmeas.

3 – HIPÓTESES

H₁ – A duração do chamamento, o número de chamadas e o início do chamamento são influenciados pela idade da fêmea. Espera-se que fêmeas mais velhas iniciem o chamamento mais cedo que fêmeas mais jovens.

H₂ – As fêmeas produzem um feromônio sexual responsável pela atração dos machos.

H₃ – Os machos são atraídos pelo feromônio sexual produzido pelas fêmeas.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - CRIAÇÃO DA TRAÇA-DO-COQUEIRO

Para iniciar a criação do inseto em questão, foram coletados cocos atacados por larvas da traça-do-coqueiro *A. subrufella* periodicamente em plantações de coqueiro no município de Pirambu-SE (Figura 02). Os cocos foram levados para o Laboratório de Entomologia da UFS e mantidos individualmente em potes plásticos em ambiente com temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 75% até a transformação das lagartas em pupas, que na maioria das vezes ocorre fora do coco. As pupas foram colocadas em potes plásticos sobre papel filtro umedecido até a emergência dos adultos.



Figura 02: Frutos de Cocos nucifera com sinais de infestação da lagarta de *Atheloca subrufella*, identificável pelos grânulos de fezes unidos por fios de seda.

A criação e manutenção foram adaptadas a partir da metodologia de Santana et al. (2011). Os adultos que emergiram foram colocados juntos em potes plásticos (16 cm de altura \times 13 cm de diâmetro) revestidos internamente por papel toalha, com tampa feita de tela fina do tipo voil e com um chumaço de algodão umedecido com mel a 2% para alimentação. Após o acasalamento em laboratório e posterior postura no papel toalha, os ovos foram retirados e mantidos em placa de petri com papel filtro umedecido com água destilada, cobertos com filme de PVC. Após a eclosão dos ovos, as lagartas foram colocadas em novos frutos de aproximadamente 10 a 15 cm de altura, na proporção de 3 ou 4 lagartas para cada coco. Esses frutos sadios foram colhidos diretamente do cacho, lavados com água e detergente neutro, imersos durante 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1% e posteriormente lavados em água corrente. Com bisturi cirúrgico, foram feitas cavidades triangulares de

aproximadamente 0,5 cm de lado e profundidade, na região próxima as brácteas, e as lagartas então eram inseridas individualmente em cada cavidade com auxílio de pincel (Figura 03). Os frutos foram mantidos em pé em potes com suporte de espuma, cobertos com tecido do tipo voil, e forrados com papel toalha para reter a umidade, bem como servir de substrato para formação de pupas. As pupas oriundas da criação foram separadas por sexo (Figura 04) e individualizadas em potes plástico com a finalidade de utilizar os adultos virgens recém-emergidos nos bioensaios.



Figura 03: Coco contendo lagartas em cavidades triangulares feitas abaixo da bráctea

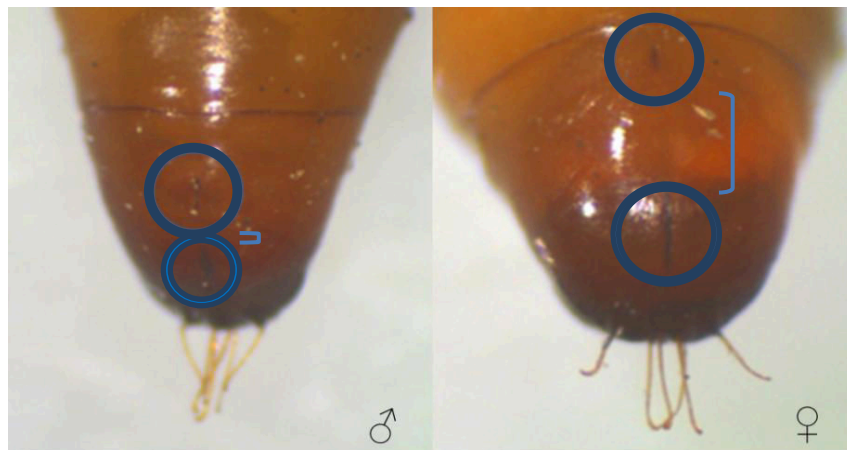


Figura 04: Pupas macho e fêmea respectivamente, com destaque a morfologia da região diferenciadora. A distância entre as áreas circuladas diferencia o sexo.

4.2 - COMPORTAMENTO DE CHAMAMENTO

O comportamento de chamamento de *A. subrufella* foi avaliado ao longo de 16 dias. Foram separadas 34 fêmeas em estado de pupa, e mantidas individualmente em copos plásticos transparentes, em ambiente a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \pm 5\%$ UR e fotoperíodo de 14L:10E. Desde a emergência até a morte, todas as fêmeas foram observadas a cada 10 minutos durante toda a escotofase, com o auxílio de uma lupa e lanterna com luz LED coberta com 6 camadas de papel celofane vermelho. Foi considerado que uma fêmea estava chamando quando o abdômen estava curvado e o ovipositor estendido. Uma chamada foi cada evento de exposição do ovipositor. Se uma fêmea estava chamando em somente uma observação foi considerado que a chamada durou 10 min. Entretanto, se a fêmea estivesse chamando durante duas observações consecutivas considerou-se que ela estava chamando por 20 min.

Nesse experimento foram analisados a posição de chamamento, o padrão e periodicidade da emissão do feromônio sexual de fêmeas virgens de *A. subrufella*.

4.3 - EXTRAÇÃO DA GLÂNDULA DE FEROMÔNIO

Posteriormente à elucidação do período de chamamento, foi feita a retirada das glândulas de novas fêmeas virgens no período em que foi detectada uma maior porcentagem de fêmeas chamando e durante o intervalo de maior chamamento. Essas glândulas foram retiradas das fêmeas virgens através de uma pequena pressão na região terminal do abdômen para que ocorresse exposição da glândula e posterior retirada com pinça esterilizada. As glândulas ficaram emersas em hexano, na proporção de 50 μl por glândula, durante 20 minutos em frascos de vidro de 2 ml, e o extrato resultante foi posteriormente filtrado e estocado a -20°C para a utilização nos bioensaios.

4.4 – AERAÇÃO DOS VOLÁTEIS

Como forma alternativa para obtenção do feromônio sexual, os voláteis liberados dos adultos de *A. subrufella* foram coletados por meio do processo de aeração. Para isso, grupos de 30 machos e 30 fêmeas alimentados com um algodão embebido em solução de mel a 2% foram mantidos separados em um sistema de câmaras de vidro, sendo que na entrada do sistema foi adaptada uma coluna de carvão ativado e outra coluna de água destilada, para filtrar o ar, que seguia a um fluxo de 1L/min, fazendo com que os voláteis fossem arrastados

até a extremidade oposta da câmara, ficando retidos em uma coluna contendo lã de vidro e 0,055g de polímero adsorvente Porapak Q (copolímero de p-divinilbenzenovinilbenzeno) (Figura 05). Após 24h de aeração, o processo de dessorção dos voláteis retidos na coluna foi feito utilizando 2ml de hexano. O extrato obtido foi então filtrado com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro com um pequeno chumaço de algodão, para reter pequenas partículas e escamas de asas dos adultos e posteriormente armazenado em freezer a -20°C . Os voláteis foram coletados diariamente durante 10 dias.



Figura 05: Sistema de aeração para coleta de voláteis, com bomba de vácuo, câmaras de vidro contendo machos e fêmeas de *Atheloca subrufella* isolados, colunas com polímero adsorvente, filtros de carvão ativado e água destilada.

4.5 – ANÁLISE DOS EXTRATOS DE GLÂNDULAS E EXTRATOS OBTIDOS NA AERAÇÃO POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

Uma alíquota de $1\ \mu\text{l}$ de cada extrato de glândulas e os da aeração foi injetada individualmente em um cromatógrafo a gás acoplado à um espectrometro de massas (CG-MS) 70 eV (EI), utilizando-se um Shimadzu QP 5050A, contendo uma coluna capilar DB-5 (30m x 0.25mm x 0.25 μm) no modo “splitless”. As condições de análise foram as seguintes: temperatura inicial de 50°C por 1 minuto com aumento de 7°C por minuto até uma temperatura final de 250°C , a qual foi mantida por 10 minutos.

Após o término das corridas, os cromatogramas obtidos a partir da aeração de machos e fêmeas foram comparados entre si para a detecção das diferenças entre os compostos químicos liberados por cada sexo.

4.6 - BIOENSAIOS EM LABORATÓRIO

A resposta comportamental de machos ($n=38$) à presença do extrato da glândula da fêmea e do extrato obtido por aeração foi testada em olfatômetro em Y, que consistiu em um tubo de vidro em formato de Y com 5 cm de diâmetro, tendo o tubo principal 30 cm de comprimento e 30 cm em cada um dos dois braços menores (Figura 06). O olfatômetro foi operado com um fluxo de ar de 2L/min previamente umidificado e filtrado com carvão ativo. O fluxo de ar foi produzido por bomba de vácuo. Os bioensaios foram conduzidos entre a 3^a e 7^a horas da escotofase a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $65 \pm 15\%$ UR.

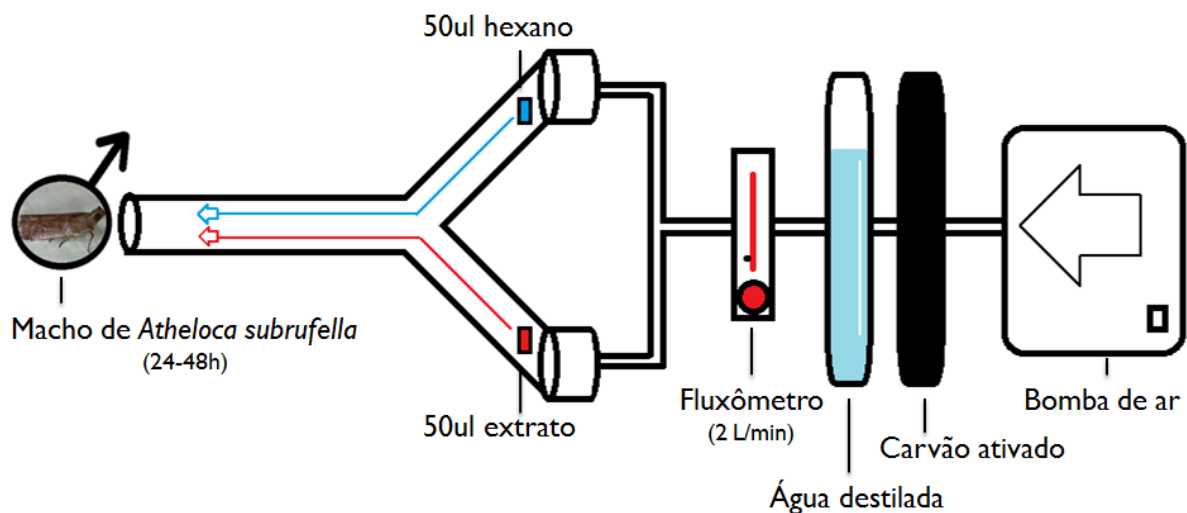


Figura 06: Esquema de olfatômetro em Y, com o macho de *A. subrufella* em uma extremidade e papel filtro contendo extrato de glândulas / extrato obtido por aeração e controle (hexano) nas outras extremidades, acopladas a bomba de ar gerando fluxo contínuo.

Em uma das extremidades do olfatômetro foi colocado um pedaço de papel filtro com 50 µl do extrato de glândulas das fêmeas / extrato obtido pela aeração, sendo que na outra extremidade foi colocado o pedaço de papel filtro impregnado com 50 µl de solvente (hexano), utilizado como controle. Um macho virgem com 24-48h de vida foi introduzido na base do olfatômetro e seu comportamento em direção a um dos braços do equipamento foi observado durante 20 min com auxílio de lanterna com papel celofane vermelho. Foi registrado como “sem-escolha” quando o inseto permanecia parado no tubo principal, e registrado como “escolha” quando ele se direcionava para um dos braços menores, pelo menos 5 cm após a divisão da base do tubo, permanecendo lá por, no mínimo, 2 min.

Foram utilizados 38 machos e cada indivíduo foi testado apenas uma vez, de forma que 28 machos foram usados nos testes com extratos com glândulas e 10 machos nos testes com extratos por aeração. O posicionamento das fontes de odor foi trocado a cada teste. Os insetos que não responderam (“sem-escolha”) não foram utilizados nas análises estatísticas.

4.7 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos com o experimento de análise do comportamento de chamamento foram analisados usando ANOVA com modelos lineares generalizados (GLM). Foram verificados se o número de chamadas, a duração das chamadas e o horário de início do chamamento foram alterados com a idade das fêmeas (escotofases).

A simplificação dos modelos foi testada por meio de análise de resíduos, com teste F ($p < 0,05$) (Crawley 2002).

Os resultados de todos os bioensaios em olfatômetro foram analisados com um teste binomial ($p < 0,05$). Indivíduos que não fizeram escolha foram excluídos da análise estatística.

Todas as análises foram feitas utilizando-se o programa estatístico R (R Development Core Team 2005).

5. RESULTADOS

5.1 Comportamento de chamamento

A posição de chamamento adotado pelas fêmeas de *A. subrufella* foi caracterizado pela curvatura do abdômen para cima, protrusão da extremidade do ovipositor e constante antenação (Figura 07). Na maior parte do tempo, enquanto esse comportamento era apresentado, a fêmea ficava imóvel, porém, não era incomum a fêmea interromper o chamamento e se mover esporadicamente, voltando em seguida à mesma posição.



Figura 07: Fêmea de *A. subrufella* em posição de chamamento, com destaque à glândula exposta.

Esse comportamento só foi visualizado durante a escotofase, e caso a fêmea estivesse chamando ao final desta, interrompia o comportamento imediatamente após o início da fotofase.

Foi verificado nesse experimento que de 34 fêmeas observadas, apenas 5 (14,7%) não realizaram o comportamento de chamamento durante toda a sua fase adulta, enquanto todas as outras 29 (85,3%) chamaram. Foi observado que somente 7 fêmeas (20,5%) chamaram em sua primeira escotofase, no tempo médio de 280min após o início da fase escura, com duração

média de 54 minutos. No entanto a maior porcentagem de fêmeas chamando ocorreu entre a segunda e a quinta escotofase ($P < 0,001$) (Figura 08).

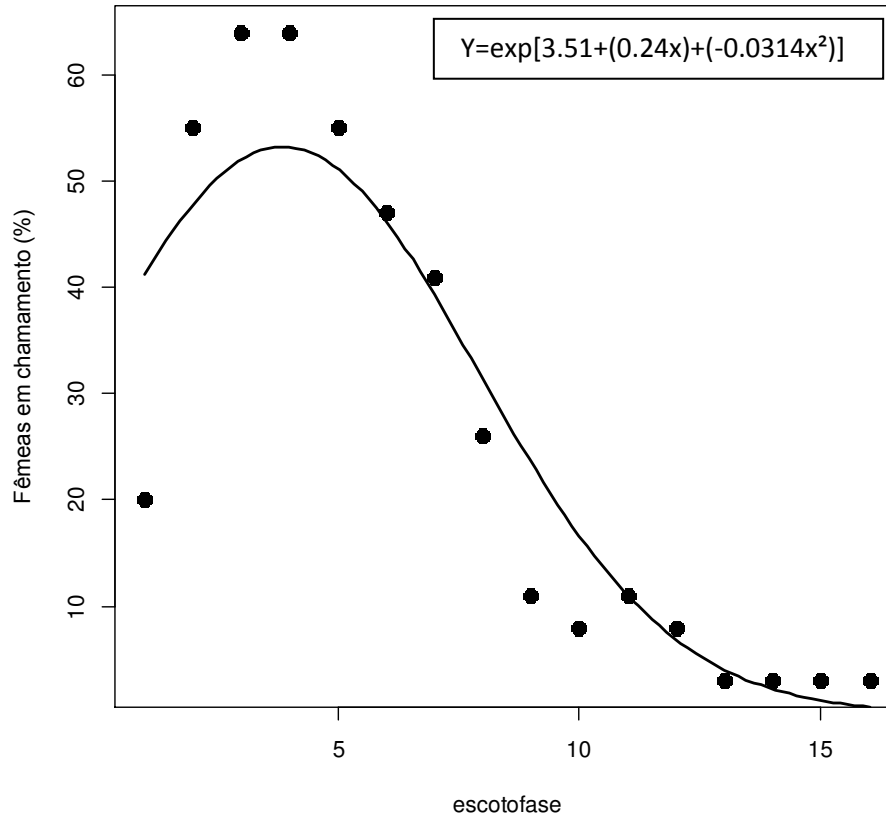


Figura 08: Porcentagem de fêmeas virgens de *A. subrufella* chamando durante dezesseis escotofases consecutivas.

As 19 fêmeas (55,8%) que chamaram na segunda escotofase gastaram uma média de 129min chamando, e o início do comportamento se deu em média aos 238min. O pico de maior atividade de chamamento se deu na terceira e quarta escotofases, em que 22 fêmeas (64,7%) iniciaram o comportamento mais cedo (média de 210min para o terceiro dia e 168min para o quarto dia), e chamaram em média 162min e 173min, respectivamente. A partir da quinta escotofase, uma menor proporção de fêmeas chamou (55,8%), equiparando-se à segunda escotofase, no entanto, o início do chamamento foi mais cedo: Em média começou aos 141min, tendo duração média de 195min. Portanto, ocorreu uma queda na proporção de fêmeas chamando ao longo das escotofase, após o quarto dia de vida.

Em relação à duração do chamamento com a idade das fêmeas, pode-se observar na figura 09 que apesar do valor médio da duração do chamamento indicar uma tendência de

aumento nos primeiros dias, os desvios padrões confirmam que não houve diferença significativa entre a duração em relação às escotofases ($P > 0,05$).

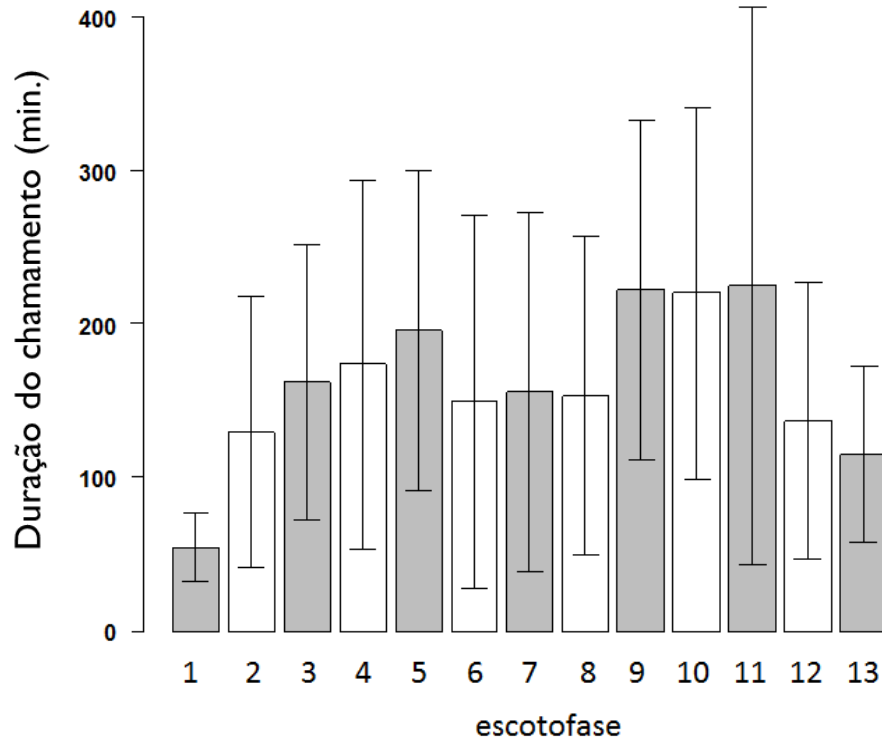


Figura 09: Duração média do chamamento de fêmeas virgens de *Atheloca subrufela* durante treze escotofases consecutivas.

De forma geral, pode-se ver que o chamamento teve início cada vez mais cedo com o passar das escotofases (Figura 10), de maneira que as fêmeas mais velhas iniciavam o comportamento antes das fêmeas mais novas ($P < 0,001$). Enquanto a média do início do chamamento na primeira escotofase foi de 280min, na sétima escotofase, por exemplo, esse valor foi de 116min.

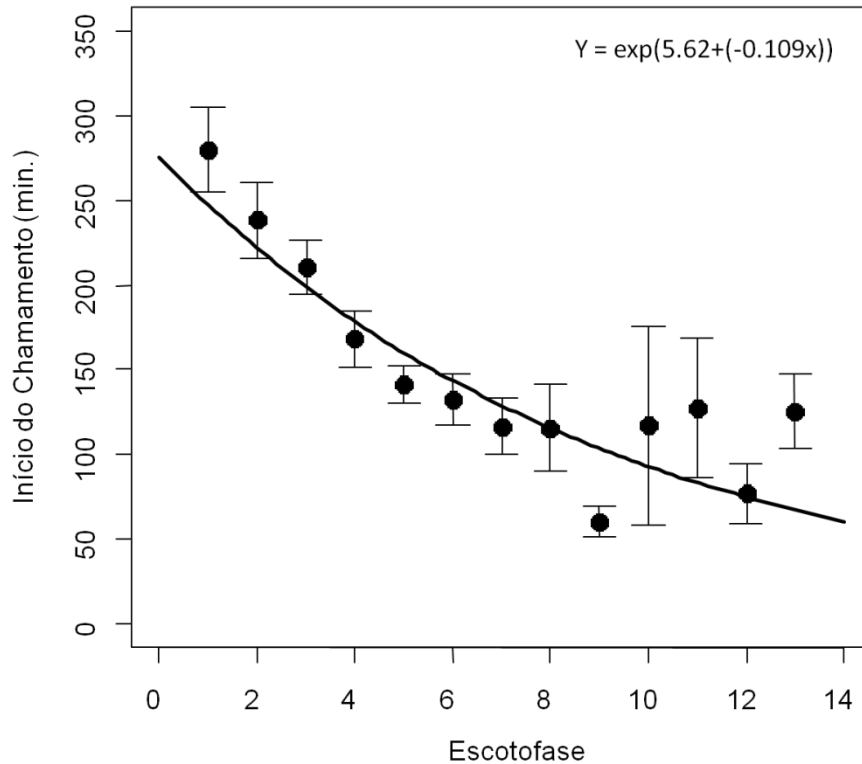


Figura 10: Início do chamamento de fêmeas virgens de *A. subrufella*, em relação à escotofase, com média e desvio padrão.

O número médio de chamadas não diferiu entre as escotofases ($P > 0,05$) tendo uma média de uma fêmea realizando aproximadamente três chamadas em cada escotofase.

Analisando somente os dias de maior atividade de chamamento (entre a segunda a quinta escotofase, período onde há um pico de chamamento), foi possível estabelecer um padrão em relação ao horário do chamamento, levando em conta que, conforme demonstrado na Figura 10, o chamamento é antecipado ao longo das escotofases. Comparando as dez horas de observação dentro de cada uma das quatro escotofases de interesse (entre a 2ª e 5ª), foi possível determinar o período de maior atividade dentro da escotofase, conforme demonstrado na Figura 11. A partir desses resultados, é possível verificar que o melhor horário para realizar a extração da glândula é entre a terceira e a sétima hora, tendo em vista que é quando houve uma maior proporção de fêmeas chamando ($P < 0,001$).

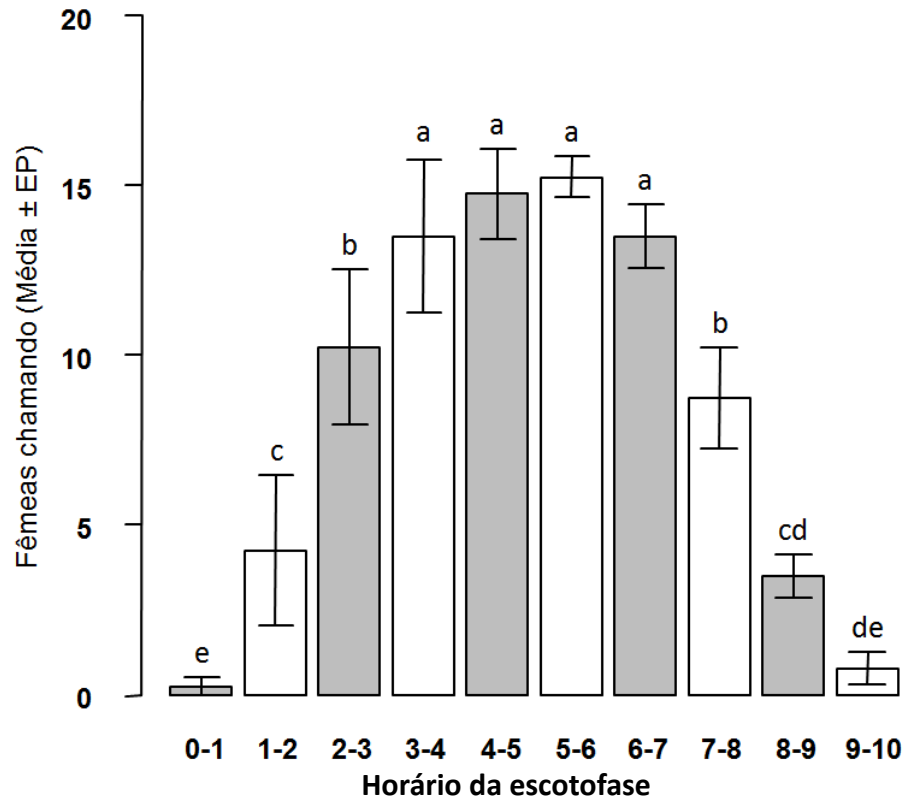


Figura 11: Padrão temporal do comportamento de chamamento exibido por fêmeas virgens de *A. subrufella* entre a segunda e quinta escotofases. Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença significativa ($P < 0,05$, Teste Tukey).

5.2 Análise dos extratos de glândulas

A partir das análises cromatográficas dos extratos obtidos a partir das glândulas retiradas de fêmeas virgens não foi possível verificar nenhum composto feromonal nos cromatogramas.

5.3 Análise dos extratos obtidos pela aeração

Os perfis cromatográficos obtidos a partir da aeração das fêmeas e machos de *A. subrufella* não demonstraram a presença de compostos feromonais específicos da fêmea, sugerindo também não haver diferenças entre os compostos voláteis entre os sexos (Figura 12).

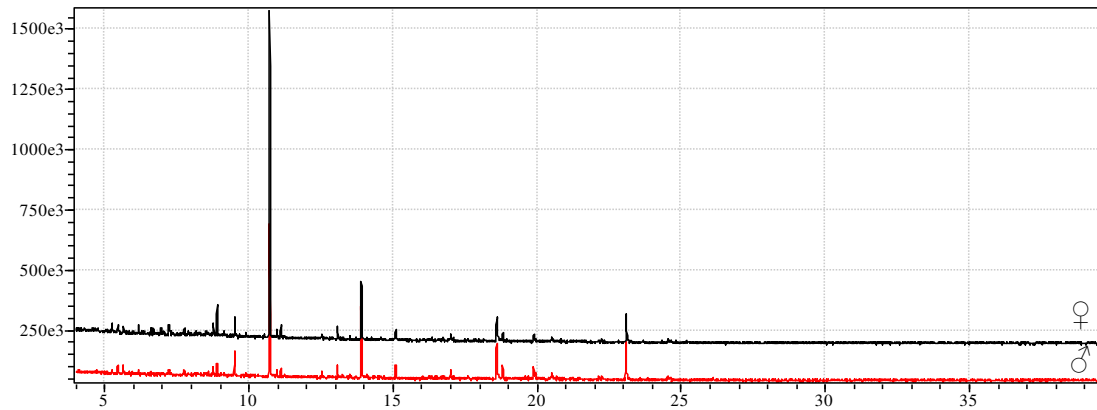


Figura 12: Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por aeração das fêmeas (em preto) e machos (em vermelho) de *A. subrufella*

5.4 Bioensaios em olfâmetro em Y

Dos 38 machos testados, 28 foram testados usando o extrato de glândulas, dos quais apenas 6 responderam ao extrato e o mesmo número respondeu ao hexano, enquanto 16 não demonstraram resposta, conforme a Tabela 01. Sendo assim, após análise foi possível verificar que não houve diferença significativa entre os tipos de fonte de odor ($P > 0,05$).

Tabela 01: Número de machos de *A. subrufella* atraídos à diferentes fontes de odor em olfâmetro em Y

Resposta	Machos
Hexano	6
Extrato de glândulas	6
Sem Resposta	16
Total	28

Posteriormente, foi realizado um novo teste com outros 10 machos, utilizando os extratos obtidos pela aeração. Nenhum indivíduo apresentou resposta comportamental, não sendo possível realizar análise estatística.

6. DISCUSSÃO

A posição adotada pela fêmea de *A. subrufella*, caracterizada pela extensão do ovipositor para expor a glândula é a característica principal do comportamento de chamamento, visualizada em vários outros lepidópteros (Turgeon & McNeil 1982, Parra-Pedrazzoli & Leal 2006, Castrejón-Gómez 2010). Essa também foi a única posição adotada pela fêmea, ao contrário de outras espécies que podem apresentar mais de uma posição de chamamento (Ambrogi et al. 2009, Osorio & Cibrián 2000). É bem documentada a influência que a posição de chamamento tem na liberação de feromônios. Conner & Best (1988) demonstraram que a posição das asas ou o batimento delas podem direcionar o fluxo de ar e aumentar a volatilidade do feromônios. Apesar da fêmea de *A. subrufella* não bater as asas durante o chamamento, o fato de ela curvar o abdômen pra cima parece facilitar a emissão dos feromônios, como acontece, por exemplo, em *Elasmopalpus lignosellus* (Pyralidae), descrito por Pires et al. (1994) e *Ephestia cautella* (Pyralidae) (Barrer & Hill 1977).

Os resultados do início do chamamento divergem dos resultados encontrados em Bento et al.(2006), que também trabalharam com a traça-do-coqueiro. Apesar de terem trabalhado apenas com acasalamento, os pesquisadores atestaram não encontrar comportamento de chamamento para a fêmea com exposição de glândula. Isso pode ser justificado pelo fato dos casais terem sido criados juntos, mantidos num mesmo local desde quando eram pupas. O fato de macho e fêmea estarem próximos pode ser o suficiente para a fêmea não emitir o feromônio sexual por meio da posição de chamamento, e o reconhecimento entre eles deve ser feito de outra maneira. Além disso, verificaram que o acasalamento em *A. subrufella* ocorre no primeiro dia de vida, porém os resultados do presente estudo demonstram que apenas 20,5% das fêmeas avaliadas realizaram o comportamento de chamamento no primeiro dia, enquanto 79,5% o fazem nos dias seguintes. Os autores dizem também que nos primeiros dois dias, o número de fêmeas que emergiram antes dos machos foi significativamente maior, indicando que a espécie apresenta protoginia. Apesar deste padrão ainda não ser muito bem entendido em insetos (Thornhill & Alcock 1983), a partir dos resultados obtidos pode-se relacionar o fato de a fêmea emergir antes do macho com o maior chamamento a partir de seu segundo dia de vida, pois neste tempo, em teoria, haveria mais machos disponíveis, sendo desta forma uma estratégia para otimizar o acasalamento.

Além disso, a maioria das espécies de lepidoptera chamam no primeiro dia (Webster & Cardé 1982), como em *Tuta absoluta* (Gelechiidae), que de acordo com Uchoa-Fernandes

et al. (1995) as fêmeas são sexualmente maduras em seu primeiro dia de vida, o que foi atestado devido ao fato delas já chamarem logo após a emergência. Também é comum encontrar outras espécies que iniciam seu chamamento após o segundo dia de vida, como *Palpita unionalis* (Pyralidae) (Mazomenos et al. 2002). Isso se deve ao fato de que há uma correlação conhecida entre a produção de feromônios, desenvolvimento ovariano, e o comportamento de chamamento (Turgeon & McNeil 1982, Swier et al. 1976). Sendo assim, é possível que nem todas as fêmeas já apresentem maturidade sexual, ou tenham óvulos maduros logo ao emergirem. Em relação a idade fisiológica da fêmea, o número de chamadas e duração do chamamento em *A. subrufella* não mudou conforme o passar das escotofases, contrastando com os resultados de outros trabalhos, como o encontrado para uma importante praga em cultivos de Álamo (*Populus* sp.), *Condylorrhiza vestigialis* (Crambidae) (Ambrogi et al. 2009), e para *Hydraecia micacea* (Noctuidae), praga da batata (West et al. 1984).

No entanto, a idade fisiológica da fêmea apresentou uma grande influência no início do comportamento de chamamento por parte das fêmeas de *A. subrufella*. Enquanto as fêmeas mais novas demoravam mais para começar a chamar, as fêmeas mais velhas anteciparam o chamamento durante a escotofase. Este comportamento pode ser compreendido como uma estratégia da fêmea mais velha para evitar a competição com as fêmeas mais novas, pois sabe-se que a idade do inseto tem relação fundamental com as taxas de fecundidade. Em *Leucoptera coffeella* (Lyonetiidae), foi verificado que fêmeas mais novas (de um a três dias de idade) tiveram taxas mais altas de fecundidade e maior viabilidade dos ovos do que fêmeas mais velhas (cinco dias de idade) (Michereff et al. 2004). Em fêmeas mais velhas de *Copitarsia consueta* (Noctuidae), foi verificado resultado semelhante: fêmeas mais velhas depositaram menos ovos e tiveram uma diminuição na fertilidade em relação às fêmeas mais novas (Rojas & Cibrian-Tovar 1994). Esse comportamento é bastante comum entre outras espécies de Lepidoptera (Delisle 1992, Turgeon & McNeil 1982, Swier 1977), pois de acordo com Webster e Cardé (1982), as fêmeas mais velhas teriam menos feromônios do que as mais novas, portanto, ao antecipar o chamamento, a fêmea mais velha aumenta suas chances de acasalar, por ser a primeira a atrair o macho, dessa forma evitando competição com as mais novas. Isso ficou atestado também em *Sesamia nonagrioides* (Noctuidae), conforme Babilis & Mazomenos (1992). Nesta mariposa, os acasalamentos ocorreram até o terceiro dia, período em que houve o máximo de chamamento. Nas fêmeas mais velhas, a quantidade de feromônios encontrada foi significativamente menor do que em fêmeas virgens com a mesma idade. Em *A. subrufella*, os dados corroboram com a ideia de que as fêmeas mais velhas

provavelmente tem menos feromônio que as fêmeas mais novas, justificando o fato de chamarem antecipadamente.

Além da idade fisiológica da fêmea, outro fator que pode regular a produção e emissão de feromônios sexuais em Lepidoptera é a presença de feromônios de coespecíficos, que de acordo com McNeil (1991), pode antecipar ou adiar esta produção. Essa auto-deteção é observada em várias famílias de Lepidoptera, e acredita-se que, em caso de alta densidade populacional, as fêmeas podem perceber o feromônios das outras e assim, realizar uma dispersão como estratégia para evitar a competição por machos, ou fontes de alimento. Palanaswamy & Seabrook (1985) demonstraram que em *Choristoneura fumiferana* (Tortricidae), a fêmea exposta ao feromônio tende a chamar mais cedo, corroborando com a ideia de evitar a competição. Para *A. subrufella*, no entanto, este fator parece não influenciar no comportamento de chamamento, pelo menos sob as circunstâncias em que o experimento foi realizado. As fêmeas mantiveram a idade fisiológica como principal fator de regulação para o ritmo do chamamento, uma vez que aparentemente agiram da mesma maneira estando ou não na presença de coespecíficos, isto é, as primeiras fêmeas que emergiram num ambiente sem feromônios se comportaram da mesma maneira que aquelas que emergiram num ambiente com outras fêmeas chamando. No entanto, se fazem necessários novos estudos específicos para avaliação deste fenômeno.

Conforme relatado, os cromatogramas não evidenciaram diferenças entre machos e fêmeas que pudessem sugerir a existência de um feromônio sexual no extrato dos voláteis das fêmeas. Zarbin e colaboradores (1999) sugerem que para determinar o composto biologicamente ativo de interesse deve-se comparar os cromatogramas de machos e fêmeas obtidos, pois o feromônio em questão só estará presente em um deles. A partir da detecção dessa diferença, ocorre a elucidação estrutural do componente desejado, para em seguida identificá-lo como uma substância de atração sexual (Dunkelblum & Kehat. 1989, Cork et al. 1992). O fato de, no presente trabalho, os cromatogramas não ter apresentado essa diferença, não significa necessariamente que a fêmea não produza feromônio, pois nem sempre apenas essa comparação é suficiente, já que usar apenas essa metodologia pode não apresentar eficácia em alguns casos (Zarbin et al. 1999).

Os bioensaios não tiveram o resultado esperado pelo fato dos machos não apresentarem resposta comportamental que indicasse a presença do feromônio, corroborando com os resultados encontrados nos cromatogramas dos extratos. Sabe-se que diversos fatores podem afetar a resposta comportamental do macho em relação ao feromônio, como exposição prévia a outras fêmeas (Mafra-Neto & Baker 1996), no entanto, para o presente trabalho, esse

fator foi evitado devido ao fato dos experimentos com os machos terem sido realizados em outro ambiente, longe e sem contato com nenhuma fêmea. O tempo de observação foi de 20 minutos para cada indivíduo, o que pode ser suficiente para a maioria das espécies, já que alguns lepidópteros geralmente são atraídos logo após a introdução no sistema (Witzgall & Priesner 1984). Sendo assim, uma razão que pode sugerir o motivo dos machos não terem efetuado o comportamento de corte é por não haver feromônios nas amostras testadas.

A primeira metodologia utilizada para obtenção dos extratos foi a extração das glândulas de fêmeas virgens. Essa metodologia é bem difundida principalmente para Lepidoptera (Eiras 2000, Cork et al. 1992, Ambrogi et al. 2009, Huang et al. 1998). Apesar de ser prática e rápida, o resultado do composto coletado no final pode ter uma grande quantidade de impurezas, como hidrocarbonetos, e ácidos graxos (Zarbin et al. 1999) o que pode comprometer as amostras. A aeração foi utilizada como forma alternativa de obtenção de extrato após os testes iniciais feitos com os extratos da glândula não terem dado uma resposta satisfatória. Essa metodologia garante que somente os compostos voláteis sejam capturados, mas ela pode não ser totalmente adequada para o inseto em questão, um microlepidoptera que possui pequenas escamas em suas asas que podem se soltar e assim contaminar o extrato final. Para as duas metodologias, alguns fatores podem ter influenciado na ausência de um possível feromônio sexual das fêmeas.

É possível que os feromônios tenham evaporado durante sua manipulação, que envolve desde o processo de extração, ou até mesmo durante a concentração. Os feromônios sexuais de lepidópteros em geral são bastante voláteis, possuem característica multicomponente, e podem ser baseados em estruturas básicas como álcoois, acetatos, aldeídos e duplas ligações (Ando 2005). Esses compostos geralmente são obtidos em pequenas quantidades, de μg a mg , e são formados por moléculas orgânicas de baixo peso molecular, o que garante a volatilidade da molécula e as vezes sua instabilidade. Sendo assim, essa é uma das maiores dificuldades de se trabalhar com feromônio, seja com isolamento, identificação ou aplicação, pois além deles serem produzidos e liberados em quantidades muito pequenas, podem ser mascarados pela liberação de compostos defensivos ou quimicamente semelhantes, embora inativos, o que torna sua difícil manipulação (Thomazini 2009, Junges 1995).

Num possível trabalho futuro, sugere-se a adoção de outras metodologias alternativas para tentar verificar a existência de feromônio nas fêmeas de *A. subrufella*, como por exemplo, a eletroantenografia acoplada à cromatografia gasosa. Esse método consiste na exposição de estímulos químicos às antenas do inseto, o que permite ao pesquisador

identificar os compostos que geram respostas eletrofisiológicas na antena do indivíduo em questão, no caso, um macho. Estudos realizados com essa técnica tem demonstrado que a antena do inseto pode ser um detector mais sensível do que os equipamentos de cromatografia, geralmente utilizados nas análises dos extratos (dados não publicados). Essa resposta pode indicar algum composto que pode ter um papel no comportamento que pode ser aferido após a identificação daquele composto com novos bioensaios. A vantagem desta técnica é que ela é capaz de identificar os compostos ativos no meio de tantos outros, eliminando a necessidade de realizar testes com todos os compostos encontrados (Bjostad 1998) e vem sendo utilizada amplamente em estudos do tipo para Lepidoptera (Kou et al. 1992, Badji et al. 2003, Stelinski 2006).

Uma forma alternativa para extrair os compostos presentes nas glândulas das fêmeas em projetos futuros é a microextração em fase sólida (SPME) que consiste numa fibra de sílica fundida coberta por um polímero poroso adsorvente, que adsorve os compostos químicos da amostra em questão. A posterior adsorção é feita na inserção da fibra no cromatógrafo Gasoso. Uma vantagem é que é possível capturar os compostos específicos esfregando diretamente a fibra contendo o adsorvente na glândula da fêmea (Frerot et al. 1997, Arthur & Pawliszyn 1990). Alguns trabalhos em Lepidoptera vêm utilizando essa técnica com sucesso, como em Mozuraitis et al. (1999) e Chen et al. (2006).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente trabalho, foi possível verificar alguns aspectos da ecologia química de *Atheloca subrufella*, principalmente o comportamento de chamamento e suas variações. De acordo com os resultados encontrados, verificou-se que as fêmeas chamam apenas durante a escotofase, têm apenas uma posição de chamamento, antecipam o chamamento com o passar das escotofases e não mudam o número de chamadas e nem a duração em escotofases consecutivas.

Sendo assim, analisando as Figuras 08 e 11, os resultados sugerem que o melhor horário para realizar a extração da glândula de feromônios da fêmea e para realização dos bioensaios seria na 3ª ou 4ª escotofase, quando mais de 60% das fêmeas chamam e entre a 3ª e 7ª horas por coincidir com o pico de maior atividade das fêmeas.

O feromônio sexual da fêmea talvez possa ser extraído através de metodologias alternativas, como o uso da aeração ou da microextração em fase sólida (SPME) associada a cromatografia gasosa (CG). Se encontrados, isolados e sintetizados, estes compostos podem ser utilizados para verificar a resposta comportamental de machos em condições e ambientes mais controlados, com diferentes metodologias. Comprovando a eficiência desses compostos na atração dos machos, esses resultados permitiriam o desenvolvimento de técnicas de monitoramento e coleta massal. Assim sendo, seria uma técnica a ser utilizada no manejo integrado da praga, reduzindo os custos de produção de coco e efetivando seu controle, reduzindo os problemas relacionados ao controle químico, que podem causar danos ambientais e à saúde das pessoas.

Se bem desenvolvido, um sistema de captura de machos de *A. subrufella* baseado na utilização do feromônio da fêmea pode servir para o monitoramento da espécie, com o potencial de prever o aparecimento de populações da espécie na plantação. O feromônio também pode ser utilizado para realizar o confundimento sexual, evitando que haja acasalamento entre macho e fêmea e conseqüente aumento populacional.

De forma geral, há grande potencial na utilização dos feromônios de *A. subrufella* no manejo integrado de pragas, no entanto, se fazem necessários mais estudos.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrianual. 2003. Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio. 544p.
- Alcock J. 2011. Comportamento animal – uma abordagem evolutiva. Ed 9. Artmed: São Paulo. 606p
- Ambrogi BG, Fonseca MG, Coracini MDA & Zarbin PHG. 2009. Calling behaviour and male response towards sex pheromone of poplar moth *Condylophora vestigialis* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Pest Science* 82:1, 55-60
- Ando T, Inomata S, Yamamoto M. Lepidopteran. 2005. Sex Pheromones. In: Schulz IS. (Ed.). *The chemistry of pheromones and other semiochemicals*. Berlin: Springer, New York: Heidelberg, 51-96
- Aragão WM, Castilho EL, Ferreira JMS, Ribeiro FE, Tupinambá EEM, Ferreira ML & Warwick DR. 1997. Avaliação de híbridos intervarietais do coqueiro no tabuleiros costeiros do sul do Sergipe. Aracaju: EMBRAPA-CPAT, 3p.
- Arthur CL & Pawliszyn J. 1990. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal Chem* 62: 2145-2148.
- Badji CA, Eiras AE, Cabrera A & Jaffe K. 2003. Avaliação do feromônio sexual de *Neoleucinodes elegantalis* Guenée (Lepidoptera: Crambidae). *Neotrop Entomol* 32: 221-229.
- Barnes RSK, Calow P & Olive PJW. 2005. *Os Invertebrados: Uma Nova Síntese*. 2. ed. São Paulo. Atheneu. 526p.
- Barrer PJ & Hill RJ. 1977. Some relationships between the "calling" posture and sexual receptivity in unmated females of the moth, *Ephesia cautella*. *Physiol Entomol* 2: 255-260.
- Bento JMS, Arab A, Zacarin G, Signoretti AGC & Silva JWP. 2008. Attraction of *Bucephalonia xanthophis* (Cicadellidae) to volatiles of its natural host *Vernonia condensata* (Asteraceae). *Sci Agric* 65: 634-638.
- Bento JMS, Nava DE, Chagas MCM, Costa AH, Libardi DJ & Papra JRP. 2006. Biology and mating behavior of the coconut moth *Atheloca subrufella* (Lepidoptera: Phycitidae). *Fla Entomol* 89: 199-203.
- Birch MC & Haynes KF. 1982. *Insect Pheromones*, London, Edward Arnold, *Studies in Biology*, 58p.
- Bjostad LB. 1998. Electrophysiological methods. In: Millar JG, Haynes KF. (Ed.). *Methods in chemical ecology-Chemical methods*. Kluwer: Academic Publishers, 339-375.
- Bondar G. 1940. *Insetos nocivos e moléstias do coqueiro (Cocos nucifera) no Brasil*. Salvador, Tipografia Naval, 160p.

- Botton M, Bavaresco A & Garcia MS. 2003. Ocorrência de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) danificando pêssegos na Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul. *Neotrop Entomol* 32: 503-505
- Brown Jr KS & Freitas AVL. 1999. Lepidoptera, p 227-243. In: Brandão CRF & Carvalho EM. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil. São Paulo, FAPESP, 279p.
- Brusca RC & Brusca GJ. 2007. Invertebrados. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 968p.
- Carvalho AOR. 1982. Pragas do milho e seu controle, IAPAR: Londrina, Circular Técnica, 29.
- Castrejón-Gómez VR. 2010. Evidence of a Sex Pheromone and Daily Calling Pattern of Females of *Zamagiria dixolophella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Fla Entomol* 93(2):147-152
- Castrovillo PJ & Cardé RT. 1979. Environmental regulation of female calling and male pheromone response periodicities in the codling moth (*Laspeyresia pomonella*). *J Insect Physiol* 25: 659-667.
- Chen X, Nakamuta K, Nakanishi T, Nakashima T, Tokoro M, Mochizuki F & Fukumoto T. 2006. Female sex pheromone of a carpenter moth, *Cossus insularis* (Lepidoptera: Cossidae). *J Chem Ecol* 32:669-679.
- Conner WE & Best BA. 1988. Biomechanics of the release of sex pheromone in moths: effects of body posture on local airflow. *Physiol Entomol* 13: 15-20.
- Cork A, Boo KS, Dunkelblum E, Hall DR, Jee-Rajunga K, Kehat M, Kong JE, Park KC, Tepgidagarm P & Liu X. 1992. Female sex pheromone of Oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae): Identification and field testing. *J Chem Ecol* 18: 403-418
- Corrêa AG & Sant'ana J. 2001. Fundamentos da comunicação química de insetos, p.9-22. In: Ferreira JT, Corrêa AG & Vieira PC(eds.). *Produtos naturais no controle de insetos*. São Carlos, Ed. UFSCar, 176p.
- Crawley MJ. 2002. *Statistical computing – an introduction to data analysis using s-plus*. John Wiley & Sons, London, UK.
- Cuenca MAG. 2007. A cultura do coqueiro - Importância econômica da cocoicultura no Brasil. Embrapa Tabuleiros Costeiros Nov/2007 – Sistema de produção 1 – ISSN 1678-197X. Versão eletrônica: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Coco/ACulturadoCoqueiro/importancia.htm>> Acesso em: 16 fev. 2012
- Curkovic T & Ferrera C. 2012. Female calling and male flight orientation and searching behaviors in *Callisphyrus apicicornis*: evidence for a female-produced sex attractant pheromone. *Cienc Inv Agr* 9: 147-158

- Delisle J & Mcneil JN. 1986. The effect of photoperiod on calling behavior of virgin females of the true armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haw.) (Lepidoptera: Noctuidae). *J Insect Physiol* 32: 199-206.
- Delisle J. 1992. Age-related changes in the calling behavior and the attractiveness of oblique-banded leafroller virgin females, *Choristoneura rosaceana*, under different constant and fluctuating temperature conditions. *Entomol Exp Appl* 63: 55-62.
- Dunkelblum E & Kehat M. 1989. Female sex pheromone components of *Heliothis peltigera* (Lepidoptera: Noctuidae): Chemical identification from gland extracts and male response. *J Chem Ecol* 15: 2233–2245
- Eiras AE. 2000. Calling behaviour and evaluation of sex pheromone glands extract of *Neoleucinodes elegantalis* Guenée (Lepidoptera: Crambidae) in wind tunnel. *An Soc Entomol Bras* 29: 453:460
- Ferreira JMS, Araújo RPC & Sarro FB. 2002a. Insetos e ácaros, p.10-40. In: Ferreira JMS (ed.), *Coco, Fitossanidade*. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, (Frutas do Brasil, 28). 136 p
- Ferreira JMS, De Lima MF, Santana DLQ, Moura JIL & De Souza LA. 1997. Pragas do coqueiro, p.189-267. In: Ferreira JMS, Warwick DRN & Siqueira LA (ed.). *A cultura do coqueiro no Brasil*. 2ª ed. Aracaju. Embrapa-CPATC. 292p.
- Ferreira JMS, Michereff Filho M & Lins PMP. 2002b. Pragas do coqueiro: características, amostragem, nível de ação e principais métodos de controle, p.37-57. In: Ferreira JMS, Michereff Filho M (eds) *Produção integrada de coco: práticas fitossanitárias*. Aracaju, Embrapa Tabuleiros Costeiros, 107p.
- Ferreira JMS, Michereff Filho M & Lins PMP. 2002c. Pragas do coqueiro: características, amostragem, nível de ação e principais métodos de controle. In: *Produção integrada de coco: práticas fitossanitárias*. Ferreira, J.M.S., Michereff Filho, M. Eds. Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 37-57.
- Ferreira JMS. 2009. Pragas e métodos de controle ajustados à baixa capacidade de investimento dos pequenos produtores rurais. In: *Fundamentos tecnológicos para revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no Nordeste do Brasil*. Cintra FLD et al. (Eds). Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, p. 191-218.
- Fonseca NG, Kumagai AF & Mielke OHH. 2006. *Lepidópteros Visitantes Florais de Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae) em Remanescente de Mata Atlântica, Minas Gerais, Brasil. *Rev Bras Entomol* 50: 399-405.
- Fontes HR, Ribeiro FE & Fernandes MF. 2003. *Coco, produção: Aspectos técnicos*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 106 p.
- Frerot B, Malosse C, Cain AH. 1997. Solid phase microextraction (SPME) a new tool in pheromone identification in Lepidoptera. *J High Res Chromatog* 20: 340-342.

Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Batista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramin JD, Marchini LC, Lopes JRS & Omoto C. 2002. Piracicaba: Fealq. 920p.

Geiger F et al. 2010. Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic Appl Ecol* 11: 97-105.

Ghini F & Bettiol W. 2000. Proteção de plantas na agricultura sustentável. *Cad Ciênc Tecnol* 17:61-70.

Greenfield MD & Karandinos MG. 1979. Resource partitioning of the sex communication channel in clearwing moths (Lepidoptera: Sesiidae) of Wisconsin. *Ecol Monogr* 49:403-426.

Habeck DH & Nickerson JC. 1982. *Atheloca subrufella* (Hulst.), A Pest of Coconuts (Lepidoptera: Pyralidae: Phycitinae). Florida Dept. Agr. Div. Plant Ind. 241. 2 p.

Harbone JB. 1993. Introduction to Ecological Biochemistry; Academic Press; New York. 318p.

Heinrich C. 1956. American Moths of the Subfamily Phycitinae. *US Nat Mus Bull* 207: 1-581.

Hodges RW, Dominick T, Davis DR, Ferguson DC, Franclemont JG, Monroe EG & Powell JA. 1983. Check List of the Lepidoptera of America North of Mexico. E. W. Classey Ltd. & The Wedge Entomological Research Foundation, London. 284 pp.

Hou ML & Sheng CF. 2000. Calling behaviour of adult female *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lep., Noctuidae) of overwintering generation and effects of mating. *J Appl Entomol* 124:71-75.

Huang Y, Honda H, Yoshiyasu Y, Hoshizaki S, Tatsuki S & Ishikawa Y. 1998. Sex pheromone of the butterbur borer, *Ostrinia zaguliaevi*. *Entomol Exp Appl* 89: 281-287

IBGE. 2012. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201112.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2012.

Karlson P & Lüscher M. 1959. "Pheromones": a New Term for a Class of Biologically Active Substances. *Nature* 183: 55-56.

Kingan TG, Thomas-Laemont PA & Raina AK. 1993. Male accessory gland factors elicit change from 'virgin' to 'mated' behavior in the female corn earworm moth *Helicoverpa zea*. *J Exp Biol* 183:61-76.

Kou R, Ho HY, Yang HT, Chow YS & Wu HJ. 1992 Investigation of sex pheromone components of female Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) in Taiwan. *J Chem Ecol* 18: 833-840.

- Kovaleski A, Botton M, Eiras A & Vilela E. 1998. Lagarta-enroladeira da macieira *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae): bioecologia, monitoramento e controle. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 16 p. Circular Técnica 24.
- Leal WS, Kawamura F & Ono M. 1994. The scarab beetle *Anomala albopilosa sakishimana* utilizes the same sex pheromone blend as a closely related and geographically isolated species, *Anomala cuprea*. *J Chem Ecol* 20:1667–1676
- Leal WS, Mochizuki F, Wakamura S & Yasuda T. 1992. Eletroantennographic detection of *Anomala cuprea* sex pheromone. *Appl Entomol Zool* 27:289–291
- Leal WS, Oehlschlager AC, Zarbin PHG, Hidalgo E, Shannon P, Murata Y, Gonzalez L, Andrade R & Ono M. 2003. Sex pheromone of the scarab beetle *Phyllophaga elenans* and some intriguing minor components. *J Chem Ecol* 29:15–25
- Lima ER, Vilela EF, Della Lucia TMC & Ataíde LMS. 2008. Age and time related pheromone production in coffee leafminer *Leucoptera coffeella* Guérin-Ménéville (Lepidoptera: Lyonetiidae). *J Braz Chem Soc* 19: 1659-1662.
- Lingren PD, Henneberry TJ & Bariola LA. 1980. Nocturnal behavior of adult cotton leafperforators in cotton. *Ann Entomol Soc Am* 73: 44-48.
- Mafra-Neto A & Baker TC. 1996. Timed, metered sprays of pheromone disrupt mating of *Cadra cautella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J Agr Entomol* 13: 149-168
- Mazomenos BE, Konstantopoulou M, Stefanou D, Skareas S & Tzeiranakis LC. 2002. Female calling behaviour and male response to the synthetic sex pheromone components of *Palpita unionalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *IOBC WPRS Bull*, 25: 1-10.
- Moore D. 2001. Insects of palm flowers and fruits, In: Howard FW, Moore D, Giblin-Davis RM & Abad RG. (Eds) *Insects on Palms*. CAB International, Wallingford, Oxon. 400p.
- Moraes MCB, Laumann RA, Paula DP, Pareja M, Silva CCA, Vieira HG, Naime JM & Borges M. 2008. Eletroantenografia: a antena do inseto como um biossensor. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 22p.
- Morandi Filho WJ, Botton M, Grutzmacher AD & Nunez S. 2007. Flutuação populacional de *Argyrotaenia sphaleropa* (MEYRICK, 1909) (Lep: Tortricidae) com emprego de feromônio sexual sintético na cultura da videira. *Rev Bras Frutic* 29: 213-216
- Moura JIL & Vilela EF. 1998. Pragas do coqueiro e dendezeiro. 2a ed., Aprenda Fácil, Viçosa, 124 p.
- Mozuraitis R, Borg-Karlson AK, Buda V & Ivinskis P. 1999. Sex pheromone of the spotted tentiform leafminer moth *Phyllonorycter blancardella* (Fabr.) (Lep., Gracillariidae). *J Appl Entomol* 123: 603–606
- Mozuraitis R, Buda V, Liblikas I, Unelius CR & Borg-Karlson AK. 2002. Parthenogenesis, calling behavior, and insect-released volatiles of leafminer moth, *Phyllonorycter emberizaepenella*. *J Chem Ecol* 28: 1191-1208

- Nascimento RR & Sant'Ana AEG. 2001. In: Vilela EF, Della Lúcia TMC (Eds). Feromônios de insetos: Biologia, Química e Emprego no Manejo de Pragas, 2a ed., Holos Editora: Ribeirão Preto, p. 65-71.
- Osorio OR & Cibrián-Tovar J. 2000. Conducta de cortejo del barrenador de la caña de azúcar *Diatraea considerata* Heinrich (Lepidoptera: Pyralidae). *Agrociencia* 34: 619-626.
- Parra-Pedrazzoli AL & Leal W. 2006. Sexual behavior of the navel Orange Worm, *Amyelois transitella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). *Neotrop Entomol* 35: 769-776.
- Pires SS, Vilela EF, Viana PA. 1994. Comportamento de fêmeas de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) associado a liberação de feromônio sexual. *An Soc Entomol Bras* 23: 1-12
- R Development Core Team. 2005. R A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. (www.R-project.org).
- Roelofs WL & Cardé RT. 1974. Sex pheromones in the reproductive isolation of lepidopterous species, pp 96-114, In: M. Birch (ed.) *Pheromones*. Amsterdam North Holland Publishing. 495p
- Roelofs WL & Cardé RT. 1977. Responses of Lepidoptera to synthetic sex pheromone chemicals and their analogues. *Ann Rev Entomol* 63: 969-974.
- Santana SWJ, Barros R, Torres JB & Gondim Jr MGC. 2010. Exigências térmicas da praga do coqueiro *Atheloca subrufella* (Hulst) (Lepidoptera: Phycitidae). *Neotrop Entomol* 39: 181-186
- Santana SWJ, Barros R, Torres JB & Gondim Jr MGC. 2011. Técnica de criação e aspectos biológicos de *Atheloca subrufella* (Hulst) (Lepidoptera: Phycitidae) em frutos de coqueiro. *Neotrop Entomol* 40: 14-19.
- Scott G. 2005. *Essential Animal Behavior*. Oxford: Balckwell Publishing. 202p
- Sower LL, Gaston LK & Shorey HH. 1971. Sex Pheromone of Noctuid Moths. XXVI. Female Release Rate, Male Response Threshold, and Communication Distance for *Trichoplusia ni*. *Ann Entomol Soc Am* 64: 1448-1455.
- Stelinski LL, Il'ichev AL & Gut LJ. 2006. Antennal and Behavioral Responses of Virgin and Mated Oriental Fruit Moth (Lepidoptera: Tortricidae) Females to Their Sex Pheromone *Ann Entomol Soc Am* 99: 898-904.
- Stiling PD. 1996. *Ecology: Theories and Applications*. New Jersey: Prentice Hall, 403p.
- Swier SR, Rings RW & Musick GJ. 1976. Reproductive behaviour of the black cutworm, *Agrotis ipsilon*. *Ann Entomol Soc Am* 69, 546-550.
- Swier SR, Rings RW & Musick GJ. 1977. Age related calling behavior of the black cutworm, *Agrotis ipsilon*. *Ann Entomol Soc Am* 70: 919-924

- Tamaki Y. 1985. Sex pheromones. In: Kermut GA & Gilbert LI (Eds). *Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology*, vol. 9 Pergamon, Oxford, pp. 154-191
- Thomazini MJ. 2009. A comunicação química entre os insetos: obtenção e utilização de feromônios no manejo de pragas. In: Goncalves RC, Oliveira LC (Ed.). *Embrapa Acre: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia*. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 338-354.
- Thornhill R & Alcock J. 1983. *The Evolution of Insect Mating Systems*. Harvard University Press, Cambridge. 547p.
- Tinbergen N. 1951. *The study of instinct*. New York: Oxford University Press. 228p.
- Turgeon J & Mcneil J. 1982. Calling behavior of the armyworm *Pseudaletia unipuncta*. *Entomol Exp Appl* 31:402-408
- Uchoa-Fernandes MA, Della-Lucia TMC & Vilela EF. 1995. Mating, oviposition and pupation of *Scrobipalpuloides absoluta* Meyr. *Lepidoptera: Gelechiidae*. *An Soc Entomol Bras* 24(1): 159-164
- Vilela EF & Della Lucia TMC. 1987. *Feromônios de Insetos: Biologia, Química e Emprego no Manejo de Pragas*. 1a ed, Holos Editora: Ribeirão Preto. 206p.
- Wall C. 1990. Principles of monitoring. In: Ridgway LR, Silverstein RM & Inscoc MN. (Eds.). *Behavior-modifying chemicals for insect management*. Marcel Dekker, New York. p. 9-23.
- Webster RP & Cardé RT. 1982. Relationships among pheromone titre calling and age in the omnivorous leafroller moth (*Platynota stultana*). *J Insect Physiol* 28: 925-933.
- West RJ & Bowers WW. 1994. Factors affecting calling behavior by *Lambdina fiscellaria fiscellaria* (Lepidoptera: Geometridae) under field conditions. *Physiol Chem Ecol* 23: 122-129.
- West RJ, Teal PEA, Laing JE & Grant GM. 1984. Calling behavior of the potato stem borer, *Hydraecia micacea* Esper (Lepidoptera: Noctuidae) in the laboratory and in the field. *Environ Entomol* 13:1399-1404
- West RJ, Teal PEA, Laing JE & Grant GM. 1984. Calling behaviour of the potato stem borer, *Hydraecia micacea* Esper (Lepidoptera: Noctuidae) in the laboratory and the field. *Environ Entomol* 13: 1399-1404.
- Witzgall P & Priesner E. 1984. Behavioural responses of *Coleophora laricella* male moths to synthetic sex-attractant, (Z)-S-decenol, in the field. *Z Ang Ent* 98: 15-33.
- Zarbin PHG, Ferreira J, Tércio B & Leal WS. 1999. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. *Quim Nova* 22: 263-268

Zarbin PHG. 2001. Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos. In: Vilela EF, Della-Lucia MC (Eds.). Feromônios de Insetos: Biologia, Química e Emprego no Manejo de Pragas. 2ª ed. Holos, Ribeirão Preto, Brasil, 45–50.