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

**Isolamento do caimônio de *Anagasta kuehniella* Zeller
(Lepidoptera: Pyralidae) responsável pela atração do parasitoide
Habrobracon hebetor Say (Hymenoptera: Braconidae)**

Arodí Prado Favaris

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2016**

Arodí Prado Favaris
Bacharel em Ciências Biológicas

Isolamento do cairomônio de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) responsável pela atração do parasitoide *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae)

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES BENTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

Piracicaba
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Favaris, Arodí Prado

Isolamento do cairomônio de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) responsável pela atração do parasitoide *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae)/ Arodí Prado Favaris. - - Piracicaba, 2016.

49 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Frass 2. Busca hospedeira 3. Fracionamento 4. Semioquímicos. I. Título

*Aos meus pais, Hélio e Sandra
e ao meu marido, João Marcos*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo privilégio de conhecê-lo ainda mais fazendo ciência.

Aos meus pais, Helio e Sandra, pelo exemplo e todo esforço empenhado na minha educação alicerçada nos padrões que agradam a Deus.

Ao meu marido, João Marcos, por estar ao meu lado, pelo amor verdadeiro.

À minha irmã Adna pelas dicas e momentos compartilhados juntas discutindo nosso trabalho e crescimento como cientistas.

Ao meu supervisor e orientador, prof. Maurício Bento, pela confiança no meu trabalho e incentivo para o meu crescimento profissional.

Ao prof. Parra, pela oportunidade de fazer este trabalho e empolgação de continuá-lo até o objetivo principal.

Ao prof. Paulo Zarbin pelo suporte na etapa futura de identificação química.

Ao prof. Fernando Cônsoli pelas críticas e sugestões metodológicas.

Aos alunos de pós-doutorado. Ao Weliton Dias da Silva, além da amizade, agradeço pelo auxílio no procedimento experimental, pela sugestão de análise estatística e pelas críticas. À Luiza Zazycki pela amizade, sugestões e disposição em ajudar. Ao Diego Silva pela amizade, suporte e sugestões.

À Fernanda Peñaflor, pelas sugestões experimentais, auxílio nos textos em inglês e, sobretudo, pela amizade sincera e descontraída, que nos levou a passar vários momentos juntas trocando ideias, conselhos e opiniões.

Aos alunos e ex-alunos do laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos. Todos foram compreensivos quanto à minha rotina de lidar com os assuntos do laboratório e da pós-graduação, além de se prontificarem em me ajudar.

À Lucila Wadt pela amizade e pela ajuda com os serviços burocráticos do laboratório.

À Denise Alves, pela amizade, ajuda com os textos em inglês e ideias para trabalharmos juntas em projetos paralelos.

À Emiliana Romagnoli, pela amizade, sugestões e parceria em trabalhos futuros.

Às funcionárias do laboratório de Biologia de Insetos. À Neide Zério pelos ensinamentos sobre criação de insetos e ajuda com as aulas práticas; à Cristina Jensen por disponibilizar os insetos e à Carolina Jorge pela ajuda com os documentos do laboratório.

À Marta Coletti, Andrea Sintoni e Solange Barros pela amizade, empolgação e incentivo.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Semioquímicos na Agricultura pela oportunidade de trabalho e suporte financeiro concedido pela FAPESP e CNPq.

*“Assim diz o Senhor: Não se glorie o sábio na sua sabedoria,
nem o forte, na sua força, nem o rico, nas suas riquezas;
mas o que se gloriar, glorie-se nisto: em me conhecer
e saber que eu sou o Senhor e faço misericórdia,
juízo e justiça na terra; porque destas coisas me agrado,
diz o Senhor.”*

Jeremias 9:23-24

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. Isolamento de semioquímicos	13
2.2. Cairomônios em insetos e seus potenciais de aplicação.....	14
2.3. Aspectos comportamentais e semioquímicos envolvidos na busca hospedeira de <i>Habrobracon hebetor</i>	15
2.4. <i>Habrobracon hebetor</i> no contexto de criação artificial de <i>Anagasta kuehniella</i>	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Coleta e manutenção do parasitoide	21
3.2. Extração do cairomônio	22
3.3. Isolamento do cairomônio.....	23
3.4. Bioensaios olfatométricos	25
3.5. Análise dos extratos	27
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Bioensaios olfatométricos	29
4.2. Análise cromatográfica por GC-FID e GC-MS (coluna HP-5ms)	31
4.3. Análise do pico de interesse em GC-MS (coluna Rtx-1ms)	35
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS.....	43

RESUMO

Isolamento do cairomônio de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) responsável pela atração do parasitoide *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae)

Cairomônios são semioquímicos envolvidos nas interações interespecíficas dos insetos, que beneficiam o receptor em detrimento do emissor. Uma destas interações envolve a busca hospedeira por parasitoides, que detectam estes compostos como estratégia para localizar seus hospedeiros. No caso do ectoparasitoide larval, *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae), o 'frass' de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) libera um cairomônio que atrai as fêmeas do parasitoide. Considerando que *A. kuehniella* é muito utilizada para produção de ovos, visando à criação de inimigos naturais, este cairomônio é indesejável, pois acaba favorecendo altas infestações por *H. hebetor*, podendo causar prejuízos expressivos ao longo do processo. Uma das soluções para o controle de tais infestações poderia ser o emprego de armadilhas com o semioquímico sintético. Entretanto, como o cairomônio ainda não foi identificado, este trabalho teve como objetivo o seu isolamento – a etapa inicial para sua identificação. O cairomônio foi extraído por meio da lavagem com solvente e aeração do 'frass' de *A. kuehniella*. Os extratos foram, então, testados em olfatometria de quatro vias com fêmeas do parasitoide, registrando-se o tempo de permanência em cada tratamento. O extrato de lavagem ativo foi fracionado em coluna de sílica em cinco frações, cuja atratividade também foi averiguada para proceder com o isolamento do cairomônio. Os extratos e frações foram então analisados por cromatografia gasosa por ionização em chama (GC-FID) e espectrometria de massas (GC-MS), a fim de localizar compostos exclusivos nas amostras ativas. Além disso, as frações provenientes do extrato de lavagem foram aeradas para a extração de seus compostos voláteis e também analisadas por GC-MS. O cairomônio foi isolado na fração 75% éter, indicando ser um composto polar. Por comparação dos cromatogramas, apenas um pico na coluna HP-5ms foi selecionado como pertencente ao cairomônio. Em coluna Rtx-1ms, o pico bifurcou-se, indicando que, pelo menos, um dos compostos faz parte do cairomônio. As combinações metodológicas deste trabalho conduziram ao isolamento do cairomônio presente no 'frass' de *A. kuehniella* e à seleção de pelo menos um composto que compõe o semioquímico responsável pela atração do parasitoide *H. hebetor*, resultando nas primeiras informações de sua estrutura química para sua futura identificação.

Palavras-chave: Frass; Busca hospedeira; Fracionamento; Semioquímicos

ABSTRACT

Kairomone isolation of *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) responsible for its parasitoid attraction *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae)

Kairomones are semiochemicals involved in interspecific interactions of insects that benefit the receiver to the detriment of the emitter. One of these interactions is host searching by parasitoids which detect these compounds as a strategy to locate their hosts. In the case of the larval ectoparasitoid, *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae), the 'frass' of *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) releases a kairomone that attracts females parasitoids. Considering that *A. kuehniella* has been used for egg production in order to keep natural enemy rearing, this kairomone is undesirable, because it may lead to high *H. hebetor* infestation and causes important losses during the rearing process. One of the attempts to control these infestations could be the use semiochemical-baited traps. However, as the kairomone is still unidentified, the aim of this work was to isolate it – the first step for its identification. The kairomone was extracted by solvent washing and aeration of *A. kuehniella* 'frass'. Then the extracts were tested in a four-way olfactometer with female parasitoids, registering the time taken in each treatment. The active washing extract was fractionated in five fractions in a silica column, and its attractivity was evaluated to proceed to isolation. The extracts and fractions were then analysed by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), in order to locate exclusive compounds in active samples. Furthermore, the fractions from the washed extract were aerated to extract their volatile compounds that were also analysed by GC-MS. The kairomone was isolated in the 75% ether fraction, indicating that it is a polar compound. Comparing the chromatograms, only one peak on the HP-5ms column was selected as belonging to the kairomone. On the Rtx-1ms column, the peak bifurcated, indicating that at least one of the compounds is part of the kairomone. The methodological combinations of this work provided the isolation of the kairomone present in *A. kuehniella* 'frass' and the selection of at least one compound that comprises the semiochemical that attracts *H. hebetor* parasitoid, resulting in the first source of information about its chemical structure for its future identification.

Keywords: Frass; Host search; Fractionation; Semiochemicals

1. INTRODUÇÃO

Os ovos da traça-da-farinha-do-mediterrâneo, *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), estão entre os mais utilizados em criações massais de agentes naturais de controle biológico (TAVARES et al., 1989), especialmente, de parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* (LEWIS et al., 1976a; PARRA; ZUCCHI, 2004).

Um dos principais entraves para a manutenção de criações de *A. kuehniella*, em pequena ou larga escala, é a presença do ectoparasitoide larval *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae). As fêmeas de *H. hebetor* localizam a traça por meio do seu cairomônio presente no 'frass' de lagartas de último instar (DARWISH; EL-SHAZLY; EL-SHERIF, 2003; PARRA et al., 1996). Uma vez que ocorre a infestação, elas encontram um microclima favorável para se desenvolver e multiplicar. Consequentemente, pode haver reduções de até 65% na produção de ovos de *A. kuehniella*, principalmente, quando a criação for conduzida em temperaturas mais elevadas (PARRA et al., 1989). Logo, isso pode comprometer a manutenção de populações de *Trichogramma* spp., bem como as pesquisas e/ou programas de controle biológico de pragas.

Ainda são desconhecidas medidas efetivas para controlar as infestações de *H. hebetor* em criações de *A. kuehniella*, embora em alguns locais sejam adotados mecanismos que visam à redução destas infestações, como a utilização de fechamentos herméticos em bandejas de criação e de antessalas (J.R.P. Parra, comunicação pessoal).

Os métodos de controle inofensivos ao homem e ao meio ambiente, como por exemplo, o uso de armadilhas com semioquímicos, poderiam ser eficazes na redução de infestações de *H. hebetor*. Nesse caso, armadilhas contendo o cairomônio do 'frass' de *A. kuehniella* poderia ser uma estratégia bastante apropriada.

A primeira tentativa de isolamento do cairomônio do 'frass' de *A. kuehniella* levou os pesquisadores a sugerirem a participação de, pelo menos, dois compostos responsáveis pela atração à longa distância, porém, sem nenhum resultado em relação à possível estrutura química (PARRA et al., 1996).

Diante disso, este trabalho teve como objetivo isolar o cairomônio presente no 'frass' de *A. kuehniella*, fornecendo informações importantes para sua identificação e síntese.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Isolamento de semioquímicos

Os semioquímicos são compostos químicos envolvidos na comunicação dos seres vivos. Eles são subdivididos em feromônios e aleloquímicos, uma terminologia para discriminar os compostos envolvidos nas interações intra e interespecíficas, respectivamente (NORDLUND; LEWIS, 1976).

A extração de semioquímicos geralmente resulta em uma mistura complexa de compostos, dentre os quais alguns não tem nenhuma função biológica (ATTYGALLE, 1998). Por isso, o maior desafio é descobrir quais deles são biologicamente ativos (ZARBIN et al., 1999).

A elucidação química das moléculas biologicamente ativas depende da sua separação de modo que elas fiquem mais isoladas dos demais compostos que, eventualmente, possam atrapalhar na identificação. Sendo assim, os métodos de isolamento de semioquímicos visam à otimização de estudos comportamentais relacionados à investigação química dos compostos envolvidos.

O início do processo de isolamento deve ser precedido da comprovação da bioatividade do extrato bruto (PHILLIPS, 1997). A técnica mais empregada para o isolamento de semioquímicos é o fracionamento ou cromatografia em coluna. Utiliza-se uma coluna empacotada com sílica gel, na qual o extrato bruto é aplicado e, então, inicia-se a eluição com hexano e depois com misturas de hexano e éter em proporções crescentes de polaridade (ZARBIN et al., 1999). Variações da técnica podem existir de acordo com as propriedades químicas dos compostos estudados. Por exemplo, voláteis de milho podem ser isolados por fracionamento utilizando coluna de sílica gel eluída com proporções variadas de diclorometano e éter dietílico (HIBBARD; BJOSTAD, 1990). Os hidrocarbonetos cuticulares podem ser isolados em coluna de sílica gel impregnada com nitrato de prata e eluída com mistura de hexano e ciclohexeno e, sequencialmente, com proporções crescentes em polaridade de éter dietílico com alcanos e alcenos (BELLO; MCELFRESH; MILLAR, 2015).

Cada fração obtida no fracionamento pode ser utilizada em bioensaios para a localização da bioatividade. Além disso, as frações podem ser testadas de forma combinada, pois alguns semioquímicos tem efeito sinérgico (SILVERSTEIN; RODIN; WOOD, 1967).

Outras técnicas podem ser empregadas para o isolamento de semioquímicos, porém mais dispendiosas e complexas, comparadas com o fracionamento, que envolve baixo custo, maior praticidade e possibilita o descarte de todo material utilizado, evitando futuras contaminações (ZARBIN et al., 1999). Dentre essas técnicas, destacam-se: a cromatografia em camada delgada, utilizada no isolamento de compostos de defesa (SCHILDKNECHT, 1976) e a cromatografia líquida de alta resolução ou HPLC – ‘high performance liquid chromatography’ – no isolamento de feromônios (TUMLINSON; HEATH, 1976).

2.2. Cairomônios em insetos e seus potenciais de aplicação

Cairomônios são substâncias dentro do grupo dos aleloquímicos que estão associados à comunicação interespecífica. Embora pertinentes ao emissor, os cairomônios induzem uma reposta comportamental e/ou fisiológica benéfica apenas ao seu receptor (DICKE; SABELIS, 1988). Os feromônios, que, por definição, são substâncias utilizadas na comunicação intraespecífica (DICKE; SABELIS, 1988; NORDLUND; LEWIS, 1976), podem, em outra perspectiva, agir como cairomônios (BAYOUMY; KAYDAN; KOZAR, 2011; COTTRELL et al., 2014; DWECK et al., 2010; HUIGENS et al., 2010; NORDLUND; LEWIS, 1976).

Os cairomônios são importantes no processo de busca e seleção hospedeira por parasitoides (LEWIS et al., 1976a; STEINER; STEIDLE; RUTHER, 2007; VET; DICKE, 1992). Eles podem originar-se de diversas fontes do hospedeiro, como glândulas salivares, pupas, fezes, ovos, escamas, casulos, hemolinfa e cutícula (AFSHEEN et al., 2008; BEKKAoui; THIBOUT, 1993; JONES et al., 1971; LEWIS et al., 1976a; ZHU et al., 2016). Feromônios que podem ser utilizados como cairomônios podem ser uma estratégia de espionagem dos parasitoides para localizar seu hospedeiro (HUIGENS et al., 2010) e seus potenciais sítios de oviposição (DWECK et al., 2010).

As moléculas já identificadas para compostos cairomonais podem pertencer aos grupos dos hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos, cetonas, aminoácidos e proteínas (LEWIS et al., 1976a). Mucopolissacarídeos – um complexo proteico – também já foram relatados como cairomônios (BIN et al., 1993), bem como terpenoides (GRÉGOIRE et al., 1992). Os feromônios que podem agir como cairomônios são diversos, como alguns aldeídos (DWECK et al., 2010) e álcoois (BAKKE; KVAMME, 1981).

O conhecimento do papel ecológico dos cairomônios revela o potencial de sua aplicabilidade no manejo integrado de pragas. Os cairomônios, assim como os feromônios, podem ser empregados para detectar e monitorar populações de insetos (NORIN, 2007). Desse modo, eles podem ser importantes para atração e maior permanência de parasitoides no campo (VINSON, 1992). O dobro do parasitismo em *Cadra cautella* Walker por *Trichogramma evanescens* Westwood foi observado no campo, a partir da aplicação do extrato de escamas da mariposa nas folhas contendo ovos (LEWIS; JONES; SPARKS, 1972). A aplicação do cairomônio sintético tricosano, que está presente em escamas de *Helicoverpa zea* (Boddie), aumentou a taxa de parasitismo de *Trichogramma* spp., um resultado que levou os pesquisadores sugerirem a aplicação desse composto no controle biológico (LEWIS et al., 1975). Outros compostos advindos de escamas de lepidópteros, como o pentacosano, hexacosano, docosano e nonacosano também aumentaram a eficiência de parasitismo de *Trichogramma* spp. (BAKTHAVATSALAM; TANDON, 2006; PAUL; SINGH; SINGH, 2002).

Os cairomônios podem também ser eficientes na técnica 'push-pull' (COOK; KHAN; PICKETT, 2007), como os feromônios de alarme, por exemplo, o (*E*)- β -farneseno (BRUCE et al., 2005) e acetatos de dodecil e decil (TEERLING et al., 1993b), que podem agir na atração de parasitoides de afídeos (HARDIE et al., 1999) e de predadores e parasitoides de tripes (TEERLING; GILLESPIE; BORDEN, 1993). Além disso, armadilhas contendo cairomônios podem auxiliar no monitoramento do inimigo natural para tomadas de decisão quanto à liberação dos predadores no campo (MEURISSE; COUILLIEN; GRÉGOIRE, 2008).

2.3. Aspectos comportamentais e semioquímicos envolvidos na busca hospedeira de *Habrobracon hebetor*

O sucesso reprodutivo de insetos parasitoides está diretamente associado com a capacidade de busca hospedeira. Há, pelo menos, cinco etapas a serem cumpridas para essa finalidade: (1) localização do habitat do hospedeiro; (2) localização do hospedeiro; (3) aceitação do hospedeiro; (4) adaptação no hospedeiro e (5) regulação do hospedeiro (VINSON, 1984).

A busca hospedeira pode estar associada ao sistema reprodutivo dos parasitoides, bem como a distribuição de seus hospedeiros (HARDY, 1994). Em contraste com os demais insetos que, obrigatoriamente, acasalam para se reproduzir,

a maioria dos parasitoides himenópteros podem se reproduzir sem acasalar. Isso ocorre pelo fato das fêmeas serem partenogenéticas facultativas, sendo que, apenas ovos fertilizados resultam em machos e fêmeas, enquanto que ovos não fertilizados geram apenas machos (GUERTIN et al., 1996). Sendo assim, as fêmeas terão de tomar uma decisão entre buscar seus hospedeiros e gerarem apenas machos ou priorizar o acasalamento para que gerem ambos os sexos. Contudo, essa decisão poderia ser evitada no caso de parasitoides gregários ou solitários que parasitam hospedeiros agregados, uma vez que emergem juntos e copulam entre irmãos para depois se dispersarem e buscarem seus hospedeiros (GUERTIN et al., 1996).

H. hebetor é um ectoparasitoide larval gregário com comportamento típico das espécies do mesmo gênero. Essa espécie apresenta várias sinonímias, incluindo *Bracon hebetor* Say, *Bracon brevicornis* Wesmael, *Habrobracon brevicornis* Wesmael e *Habrobracon hebetor* Say, sendo esta última a mais recentemente aceita (LONI et al., 2016).

Em relação ao comportamento gregário e reprodutivo de *H. hebetor*, as fêmeas acasalam com seus irmãos, muito embora acasalam preferencialmente com machos gerados em hospedeiros diferentes (ODE; ANTOLIN; STRAND, 1995). Uma vez acasaladas, as fêmeas de *H. hebetor* tendem a encontrar seu hospedeiro mais rápido em comparação com as virgens (DARWISH; EL-SHAZLY; EL-SHERIF, 2003; GUERTIN et al., 1996; PARRA et al., 1996).

O refúgio e a fase de desenvolvimento do hospedeiro também são fatores importantes que influenciam na busca hospedeira de *H. hebetor*. O parasitoide prefere lagartas dos últimos instares como observado em *C. cautella* e *Plodia interpunctella* (Hübner) (AKINKUROLERE et al., 2009; HAGSTRUM; SMITTLE, 1977). Os primeiros instares, além de serem menores, estão localizados no interior do alimento (refúgio), dificultando a busca hospedeira pelo parasitoide (AKINKUROLERE et al., 2009). Além disso, a liberação de semioquímicos por instares iniciais pode ser menor, dificultando sua localização (VET; DICKE, 1992). Mesmo que *H. hebetor* tenha a chance de escolher qualquer fase do desenvolvimento larval, a preferência se mantém para os últimos instares (AKINKUROLERE et al., 2009), indicando a possibilidade deste parasitoide usar pistas químicas específicas de contato concernentes à idade do hospedeiro (MATTIACCI; DICKE, 1995).

O sistema sensorial no processo de busca hospedeira é muito explorado pelos parasitoides, sendo o olfato uma estratégia importante para detectar pistas químicas

(semioquímicos), que podem carregar informações sobre o alimento do hospedeiro, sobre o próprio hospedeiro, ou então, resultante da interação de ambos e até mesmo de organismos associados a ele (VET; GROENEWOLD, 1990). Em meio a tantos estímulos em um ecossistema, os inimigos naturais devem ser capazes de detectar o sinal químico associado ao seu alvo e saber discernir se a informação recebida é confiável – quanto mais dependente é o inimigo natural do seu hospedeiro, maior a especificidade da comunicação química (VET; DICKE, 1992).

A utilização dos semioquímicos pelos parasitoides pode envolver interações tritróficas (VET; DICKE, 1992). Nessas interações estão envolvidos compostos químicos pertencentes ao grupo dos sinomônios, originados de plantas hospedeiras do hospedeiro, e cairomônios, advindos do próprio hospedeiro (NORDLUND; LEWIS, 1976). Sinomônios e cairomônios podem atuar na comunicação química a longa e curta distância (FATOUROS et al., 2008; HEDLUND; VET; DICKE, 1996; NOLDUS; VAN LENTEREN, 1983; PAUL; SINGH; SINGH, 2002; VET; DICKE, 1992), sendo o semioquímico produzido pelo próprio hospedeiro uma informação, geralmente, mais confiável, podendo indicar ao inimigo natural, por exemplo, a natureza da espécie, sua densidade no local e acessibilidade no ambiente (VET; DICKE, 1992).

Os sinomônios estão relacionados aos parasitoides que localizam seus hospedeiros em suas plantas hospedeiras. No caso de *H. hebetor*, que é um parasitoide associado normalmente às pragas de grãos armazenados, não há estudos abordando sinomônios. Portanto, as pesquisas estão voltadas, principalmente, à investigação do comportamento em relação aos compostos cairomônios, que não são necessariamente compostos pouco voláteis, como sugere o cairomônio do 'frass' de *A. kuehniella* encontrado por Parra et al. (1996).

A percepção química do hospedeiro por *H. hebetor* pode desencadear comportamentos específicos. Em experimentos de laboratório, o parasitoide encontrou seu hospedeiro *A. kuehniella* e exibiu o comportamento de movimentar as antenas e, até mesmo, inserindo-as nos orifícios de telas que impediam o contato direto com as lagartas (DARWISH; EL-SHAZLY; EL-SHERIF, 2003). Também os autores notaram que, em resposta ao hospedeiro, *H. hebetor* curvou o abdomen, um movimento típico de parasitismo.

Alguns semioquímicos já foram elucidados como pistas químicas responsáveis por esses comportamentos relacionados a *H. hebetor*. O ácido 9,10-dehidroxi-cis-12-octadecenoico e seus 4 possíveis estereoisômeros foram

identificados no extrato de lavagem do 'frass' de *C. cautela* (FUKUSHIMA; KUWAHARA; SUZUKI, 1989). O composto 2-acil-ciclohexano-1,3-diona foi identificado em glândulas mandibulares de larvas de quinto instar de *A. kuehniella*, importante para o reconhecimento do parasitoide de seu hospedeiro, estimulando comportamentos específicos (STRAND et al., 1989). O feromônio sexual de *Galleria mellonella* (L.) apresentou bioatividade em *H. hebetor*, sugerindo que ele também possa agir como cairomônio para o parasitoide localizar sítios de oviposição da mariposa (DWECK et al., 2010).

A experiência dos parasitoides com os voláteis associados aos seus hospedeiros é um fator importante que influencia na eficiência da busca hospedeira. Acredita-se que essa experiência pode ter início antes da fase adulta e resultar em aprendizagem associativa nos adultos (VET; GROENEWOLD, 1990). Existem evidências de que isso ocorre em *H. hebetor*. As fêmeas desse parasitoide tendem a responder mais rápido ao seu hospedeiro, bem como aos extratos contendo os semioquímicos do mesmo, quando apresentam uma experiência prévia a estes compostos (DARWISH; EL-SHAZLY; EL-SHERIF, 2003; PARRA et al., 1996; SHONUDA; NASR, 1998).

2.4. *Habrobracon hebetor* no contexto de criação artificial de *Anagasta kuehniella*

Os parasitoides do gênero *Trichogramma* são os mais utilizados como inimigos naturais em Programas de Controle Biológico (PARRA; ZUCCHI, 2004). Criações massais de *Trichogramma* spp. tem sido desenvolvidas para sua liberação em larga escala, desde que se verificou a viabilidade de criar tais parasitoides com *Sitotroga cerealella* (Oliver) (FLANDERS, 1927). Entretanto, a traça-da-farinha-do-Mediterrâneo, *A. kuehniella*, foi mais adequada para a criação de *Trichogramma* spp., por melhor atender às exigências nutricionais, promovendo maior longevidade e fecundidade dos parasitoides (LEWIS et al., 1976b).

Um dos entraves para a manutenção de criações de *A. kuehniella* é o *H. hebetor*, um ectoparasitoide larval de diversos lepidópteros, especialmente, aqueles pertencentes à família Pyralidae (BROWER et al., 1995). Este parasitoide ataca, preferencialmente, lagartas de último instar (BENSON, 1973). As fêmeas injetam veneno nas lagartas, paralisando-as em 15 minutos (PIEK, 1966). Então, coloca seus

ovos sobre o hospedeiro, no qual as larvas completam o seu desenvolvimento e produzem uma seda para a formação de casulos, dentro dos quais se transformam em pupas (MANZOOR et al., 2011), totalizando, aproximadamente, 13 dias de ciclo ovo-adulto a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (MAGRO; PARRA, 2001) (Figura 1).

Figura 1. Fases de desenvolvimento do ectoparasitoide *Habrobracon hebetor*. a) ovos; b) larvas; c) casulos/pupas e d) adulto. As setas indicam a duração de cada fase em dias de acordo com Magro e Parra (2001).

H. hebetor pode reduzir a produção de ovos de *A. kuehniella* em até 65%, principalmente, quando a criação for conduzida em altas temperaturas (PARRA et al.; 1989).

A atração de *H. hebetor* para criações de *A. kuehniella* ocorre devido ao cairomônio presente no 'frass' das lagartas da traça (PARRA et al., 1996).

O cairomônio responsável pela atração de *H. hebetor* para localizar lagartas de *A. kuehniella* à longa distância nunca foi quimicamente elucidado. Parra et al. (1996) sugeriram que os compostos produzidos pelas glândulas mandibulares das lagartas estimulavam a busca hospedeira, porém não seriam os responsáveis pela atração à longa distância.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e manutenção do parasitoide

Machos e fêmeas de *H. hebetor* foram coletados a partir de infestações presentes na criação de *A. kuehniella* mantida no laboratório de Biologia de Insetos, do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP.

A criação consistiu na colocação de uma a duas lagartas de último instar da traça em um tubo cilíndrico de vidro de fundo chato (23 x 83 mm) contendo dois casais do parasitoide. Machos e fêmeas foram diferenciados pela presença do ovipositor e pelo tamanho das antenas, que são mais curtas nas fêmeas (DWECK; GADALLAH, 2008; DWECK; GADALLAH; DARWISH, 2008). Após 24 horas, as lagartas parasitadas foram colocadas em placas de Petri de plástico de 60 mm de diâmetro forradas com papel filtro, nas quais se completou todo o ciclo de *H. hebetor* (Figura 2).

Os insetos foram mantidos em salas de criação a 26 ± 1 °C, fotoperíodo 12L:12E e umidade relativa $50 \pm 10\%$.

Figura 2. Criação de *Habrobracon hebetor* em laboratório. A) Tubo de vidro à frente contendo um casal do parasitoide e uma lagarta de 5º instar de *Anagasta kuehniella* para o parasitismo. B) Pupas de *H. hebetor* mantidas em placa de Petri para emergência dos adultos.

3.2. Extração do cairomônio

O 'frass' foi coletado a partir das bandejas de criação de *A. kuehniella* e, depois, peneirado para eliminar o excesso da dieta da traça.

O cairomônio foi extraído do 'frass' diretamente por lavagem em solvente orgânico e, indiretamente, por aeração. Em ambos os métodos foram utilizados de 30 a 50 g de 'frass'.

O método de lavagem consistiu na submersão do 'frass' em éter dietílico por 30 minutos (Figura 3A). Esse solvente foi escolhido baseado em Parra et al. (1996), os quais demonstraram que os extratos foram ativos quando preparados em solventes polares, comparados com aqueles preparados em solvente apolar (hexano). Após esta etapa, o solvente (extrato) foi retirado do 'frass' e armazenado a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para aeração, o 'frass' foi colocado em cuba de vidro horizontal de 500 mL. Um fluxo de ar purificado em carvão ativado a 1,3 L/min foi introduzido na cuba. Na saída do ar, foi conectada uma coluna de vidro contendo 100 mg de polímero adsorvente (Hayesep® Q 80/100 mesh, Sigma-Aldrich) (Figura 3B). Após 2-3 dias de aeração, o polímero foi eluído com 1 mL de hexano para a obtenção do extrato. O polímero foi limpo com 1 mL de hexano e retornado ao sistema de aeração. Dez aerações de 2-3 dias foram obtidas e combinadas no mesmo 'vial' contendo extratos de eluições anteriores. O extrato foi concentrado para 1 mL sob um fluxo suave de gás nitrogênio.

Todas as extrações foram realizadas em temperatura ambiente ($25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Figura 3. Extração do cairomônio do 'frass' de *Anagasta kuehniella* por lavagem (A) e aeração (B).

3.3. Isolamento do cairomônio

3.3.1. Fracionamento

O isolamento do cairomônio foi realizado por meio do fracionamento acompanhado de bioensaios. Apenas o extrato bruto obtido por lavagem e com atividade biológica foi utilizado nesta etapa. O extrato de aeração foi utilizado apenas para comparações cromatográficas.

Para o fracionamento, 4 mL do extrato bruto de lavagem foi concentrado até 100 μ L. Utilizou-se o método de purificação de amostras por cromatografia em coluna empacotada com sílica. A coluna foi preparada a partir de uma pipeta Pasteur de vidro de 146 mm contendo lã de vidro e preenchida com 2 g de sílica 60/100 mesh (Sigma-Aldrich). Após lavagens da coluna de sílica com hexano, o extrato foi aplicado. Foram realizadas eluições com 1 mL dos solventes hexano e éter dietílico e soluções crescentes em polaridade: (i) 100% hexano, (ii) 25% éter, (iii) 50% éter, (iv) 75% éter e (v) 100% éter. Um 'vial' de 1,5 mL foi colocado no final da coluna para a coleta de cada fração (Figura 4).

Figura 4. Esquema de coluna de sílica para fracionamento de amostras.

3.3.2. Aeração do extrato de lavagem e frações

O extrato de lavagem ativo (extrato bruto) e as frações ativas foram colocadas no sistema de aeração para a coleta de seus voláteis, a fim de visualizar os voláteis aos quais os parasitoides foram expostos no olfatômetro.

As amostras foram impregnadas em algodão, sendo 100 μ L para o extrato de lavagem e 50 μ L para as frações. Os algodões foram colocados em conectores de vidro e aerados com ar seco e filtrado em carvão ativado a 0,4 L/min. Na saída foi acoplada uma coluna com 30 mg de polímero adsorvente (Hayesep® Q 80/100 mesh, Sigma-Aldrich) (Figura 5).

Após 12 h, o polímero foi lavado com 200 μ L de hexano para a coleta dos voláteis. O procedimento foi repetido de acordo com o volume disponível das amostras: seis vezes para o extrato bruto e duas vezes para as frações. As eluições foram sobrepostas em um mesmo 'vial' para a concentração do extrato. O volume final foi mantido em 500 μ L e 100 μ L para as aerações dos extratos de lavagem e frações, respectivamente, por meio da evaporação com gás nitrogênio.

Figura 5. Sistema de aeração dos extratos de lavagem e suas frações impregnados em algodão.

3.4. Bioensaios olfatométricos

Os bioensaios foram conduzidos em olfatômetro de quatro vias para testar a atratividade, tanto dos extratos brutos (lavagem e aeração), quanto das frações. Os extratos e controle (apenas o solvente) foram impregnados em algodão, sendo 50 µL o volume utilizado para o bioensaio com o extrato de lavagem e suas frações e 30 µL para o bioensaio com o extrato de aeração.

Os tratamentos foram dispostos em conectores de vidro acoplados nas vias do olfatômetro, em cada qual foi regulada a vazão de 0,5 L/min de ar. A vazão de ar foi obtida por uma bomba de vácuo conectada na saída central do olfatômetro. Desse modo, o ar entrou pelas quatro vias do olfatômetro, convergindo no ponto central onde o parasitoide foi liberado. Na abertura de cada via foi colocada uma tela de inox para impedir o acesso do parasitoide até o algodão (Figura 5).

A distribuição dos tratamentos no olfatômetro foi feita de forma que a chance de escolha fosse de 50% (tratamento vs. controle). Logo, duas vias corresponderam ao tratamento e duas ao controle, posicionados de forma intercalada.

Cada repetição correspondeu a uma fêmea de *H. hebetor* de um a cinco dias após a emergência, copulada e com experiência de oviposição, pois apresentam maior rapidez e eficiência no parasitismo (DARWISH; EL-SHAZLY; EL-SHERIF, 2003; PARRA et al., 1996). O parasitoide foi introduzido no centro do olfatômetro por meio de uma ponteira de micropipeta e, durante 10 minutos, foi observado o tempo de permanência em cada quadrante. Foi considerado como “não-resposta” o tempo de permanência do parasitoide na área central do olfatômetro, pois é o local onde ocorre a convergência e mistura dos voláteis das quatro vias. A cada repetição, tratamento e controle foram substituídos e o olfatômetro, rotacionado 90° para evitar algum efeito de posição na resposta dos insetos. Foram conduzidas 15 repetições para o teste de atratividade dos extratos de lavagem e suas frações, e 11 repetições para os extratos de aeração (Figura 6).

Figura 6. Esquema de olfatômetro 4 vias utilizado para os bioensaios com o parasitoide *Habrobracon hebetor*. Setas vermelhas representam a entrada do fluxo de ar até o ponto central do olfatômetro assinalado com um “x”. Q1 a Q4 (áreas rosadas) são os quadrantes do olfatômetro nos quais o comportamento do parasitoide foi avaliado e correspondem aos tratamentos utilizados. O losango central ocupa uma área onde o comportamento do inseto é considerado como “não-resposta”.

Os bioensaios foram conduzidos na fotofase, das 11:30 às 16:00 h, quando ocorre, normalmente, a maior atividade entre os parasitoides himenópteros (ALVES et al., 2015).

Os tempos de permanência em cada quadrante do olfatômetro de quatro vias foram analisados pelo teste não-paramétrico de Friedman two-way ANOVA ($P < 0,05$). O maior tempo de permanência do parasitoide nos quadrantes do olfatômetro sob efeito de um ou mais tratamento(s) correspondeu a sua bioatividade de atração.

3.5. Análise dos extratos

As frações do extrato de lavagem foram analisadas por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (GC-FID, Shimadzu 2010). Os cromatogramas obtidos foram comparados com base na localização de picos exclusivos nas frações biologicamente ativas.

Os extratos de aeração e as frações também foram analisados em cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS, Varian 4000) em modo 'full scan' por impacto de elétrons (EI), no intervalo de massas 35 a 400 m/z. Os cromatogramas foram comparados qualitativamente utilizando o tempo de retenção e o espectro de massas dos compostos.

Os cromatógrafos (GC-FID e GC-MS) foram equipados com uma coluna capilar HP-5ms (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). A temperatura do injetor foi de 250 °C e a programação do forno foi de 50 °C inicial por um minuto, elevando a 10 °C/min até 250 °C, na qual permaneceu 70 minutos.

A análise do pico selecionado como cairomônio foi também analisado em GC-MS (QP Shimadzu2010Ultra) em modo 'full scan' por EI equipado com coluna Rtx-1ms (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm), mantendo os mesmos parâmetros de temperatura e intervalo de massas supracitados.

Um padrão de hidrocarbonetos de 7 a 30 carbonos (Sigma-Aldrich) foi analisado nas mesmas condições dos extratos para o cálculo do Índice de Kovats.

4. RESULTADOS

4.1. Bioensaios olfatométricos

Ambos os extratos brutos, de lavagem e aeração do 'frass' de *A. kuehniella*, foram atrativos para fêmeas de *H. hebetor* em relação ao controle (Figura 7). O tempo médio de resposta do parasitoide foi de $4,5 \pm 0,8$ min contra $0,2 \pm 0,1$ min para o extrato de lavagem e seu controle, respectivamente ($F = 11,27$; d.f. = 1), e $3,7 \pm 0,8$ min para o extrato de aeração contra $0,5 \pm 0,2$ min para seu controle ($F = 5,8$; d.f.= 1).

Figura 7. Resposta olfativa de fêmeas de *Habrobracon hebetor* aos extratos brutos de aeração e lavagem do 'frass' de *Anagasta kuehniella* em olfatômetro de quatro vias. * significativo pelo teste Friedman two-way ANOVA ($P < 0,05$)

Nos bioensaios contendo as frações obtidas pelo extrato bruto de lavagem do 'frass' de *A. kuehniella*, somente a fração 75% éter foi atrativa para as fêmeas de *H. hebetor* em relação ao controle (Figura 8). Neste caso, o tempo médio de resposta do parasitoide foi de $3,7 \pm 0,6$ min contra $0,9 \pm 0,2$ min ($F = 10,28$; d.f. = 1) do tratamento e controle, respectivamente.

Ao longo dos bioensaios, foi observado constante antenação do parasitoide *H. hebetor* nos quadrantes contendo os tratamentos e controle, e por diversas vezes uma curvatura do abdômen com inserção do ovipositor na tela de inox que recobria a entrada de ar dos quadrantes (Figura 9).

Figura 8. Resposta comportamental de fêmeas de *Habrobracon hebetor* às frações do extrato bruto de lavagem do 'frass' de *Anagasta kuehniella*. * significativo pelo teste Friedman two-way ANOVA ($P < 0,05$)

Figura 9. Olfatômetro de quatro vias contendo uma fêmea de *Habrobracon hebetor* durante o bioensaio olfativo. À direita, o zoom detalhando o comportamento de curvatura do abdômen da fêmea do parasitoide.

4.2. Análise cromatográfica por GC-FID e GC-MS (coluna HP-5ms)

Nas análises em GC-FID, a fração 75% éter, que foi a única biologicamente ativa, assemelhou-se mais à fração 100% éter, principalmente, com a presença de dois grandes picos no intervalo de tempo de retenção 20 a 22,5 min. Nessa região, quatro picos foram exclusivamente encontrados na fração 75% éter em análise por GC-MS (Figura 10).

Figura 10. Análise cromatográfica das cinco frações em GC-FID (A), e das frações 75% éter e 100% éter em GC-MS (B) da lavagem do 'frass' de *Anagasta kuehniella*. Os dois picos circulados na análise em GC-FID correspondem ao tempo de retenção analisado em GC-MS. As setas indicam os quatro picos exclusivos encontrados na fração 75% éter na análise em GC-MS.

Na comparação do cromatograma em GC-MS do extrato de aeração com a fração 75% éter, verificou-se que, dos quatro picos relatados anteriormente, apenas um estava presente no extrato de aeração, pois foi coincidente quanto ao tempo de retenção e espectro de massas, denominado neste trabalho como 'pico candidato' (Figura 11).

O 'pico candidato' eluiu entre os hidrocarbonetos docosano ($C_{22}H_{46}$) e tricosano ($C_{23}H_{48}$), apresentando Índice de Kovats 2261.

Figura 11. Comparação dos cromatogramas em GC-MS entre a fração 75% éter e do extrato de aeração do 'frass' de *Anagasta kuehniella*. A linha pontilhada destaca o único pico coincidente entre as amostras. Abaixo dos cromatogramas, os espectros do pico selecionado para cada amostra.

Posteriormente, a aeração das frações obtidas do extrato de lavagem confirmou a presença do 'pico candidato' nos extratos bioativos (extrato bruto e fração 75% éter). Esse procedimento eliminou os dois picos maiores, presentes nas frações 75% e 100% éter (Figura 10), indicando que não exerceram atratividade ao parasitoide *H. hebetor* durante a olfatometria (Figura 12).

Figura 12. Cromatogramas das aerações do 'frass' de *Anagasta kuehniella* obtidas a partir do 'Extrato bruto de lavagem', 'Fração 75% éter' e 'Hexano' (controle). As setas indicam o 'pico candidato'.

4.3. Análise do pico de interesse em GC-MS (coluna Rtx-1ms)

Por meio da análise de GC-MS em coluna RTx-1ms, foi possível observar que, no tempo de retenção do 'pico candidato' eluíram dois picos com espectros de massas distintos (Figura 13).

Figura 13. Cromatograma em GC-MS com coluna Rtx-1ms e espectros de massas do 'pico candidato' ao cairomônio do 'frass' de *Anagasta kuehniella*.

5. DISCUSSÃO

O cairomônio presente no 'frass' de *A. kuehniella* foi isolado pelo método de fracionamento em coluna de sílica na fração 75% éter, indicando ser uma substância polar. Pela comparação de cromatogramas, apenas um pico foi encontrado nos extratos ativos, sugerindo se tratar de um composto químico importante na atração do parasitoide. Além disso, o cairomônio demonstrou ser um composto volátil de atração à longa distância, pois foi detectado por olfatometria, de modo que as fêmeas de *H. hebetor* não tiveram contato prévio com os tratamentos. Esta evidência foi demonstrada por meio dos testes de atratividade ao extrato de aeração do 'frass', um método realizado pela primeira vez, por meio deste trabalho, para isolar apenas os compostos mais voláteis provenientes do 'frass' de *A. kuehniella*.

O ácido 9,10-dehidroxi-cis-12-octadecenoico é o único composto cairomonal conhecido e proveniente do 'frass' que atrai fêmeas de *H. hebetor*. Ele foi isolado e identificado a partir do fracionamento de extratos de lavagem do 'frass' do pirálídeo *C. cautella* (FUKUSHIMA; KUWAHARA; SUZUKI, 1989). Com base no cairomônio isolado no presente trabalho, não é possível afirmar que se trata do mesmo composto químico, muito embora ambos sejam polares. Por outro lado, tratam-se de compostos obtidos a partir de 'frass' de espécies distintas. Além disso, do ponto de vista de volatilidade destes compostos, fica difícil qualquer comparação, considerando que os autores anteriormente citados utilizaram métodos que mais se aplicam ao isolamento e percepção de semioquímicos à curta distância, baseados na extração direta e utilização de arenas sem fluxo de ar (placas de Petri). Os métodos mais empregados para estudos de semioquímicos à longa distância envolvem um fluxo de ar que possa conduzir os voláteis até o local onde o inseto é avaliado, como olfatômetros e túnel de vento em laboratório, ou em armadilhas no caso de semi-campo e campo (HARE, 1998).

A primeira evidência de atração de *H. hebetor* ao 'frass' de *A. kuehniella* foi demonstrada em túnel de vento (PARRA et al., 1996). Além disso, os autores também demonstraram que se tratava de um composto químico polar, pelo fato dos extratos ativos terem sido apenas aqueles realizados em solventes polares. Este trabalho confirmou estas primeiras evidências, a partir do isolamento em coluna de sílica na fração 75% éter, o que pode também ser utilizado em etapas futuras de elucidação química. Todavia, a aeração do 'frass', bem como dos extratos neste trabalho,

mostrou-se mais adequada, eliminando compostos menos voláteis que estavam coeluinto com o composto candidato, o que poderia atrapalhar no processo de identificação.

O 'pico candidato' bifurcou-se na coluna Rtx-1ms. Logo, dois picos coeluíram na coluna HP-5ms no tempo de retenção do 'pico candidato'. Esse resultado sugere que, pelo menos, um deles faça parte do cairomônio. Em estudo anterior, dois compostos foram sugeridos como pertencentes ao cairomônio do 'frass' de *A. kuehniella* (PARRA et al., 1996). Como os autores não geraram nenhuma informação sobre a estrutura química desses compostos, como por exemplo, o espectro de massas, não há dados suficientes para afirmar que os compostos isolados por eles referem-se aos mesmos encontrados neste trabalho.

Vários cairomônios originados do 'frass' de insetos já foram relatados como semioquímicos que atraem seus inimigos naturais à longa distância, por meio de armadilhas, tornando-se viáveis para utilização no campo (LARSSON; SVENSSON, 2009; MANSOUR et al., 2010; MEURISSE; COUILLIEN; GRÉGOIRE, 2008; MURAI; IMAI; MAEKAWA, 2000). Embora os resultados deste trabalho, tenham confirmado que o parasitoide *H. hebetor* foi capaz de detectar os voláteis do 'frass' de *A. kuehniella*, a identificação química do cairomônio é uma etapa ainda necessária para sua síntese e comprovação de atratividade em armadilhas, além de averiguar se outros odores como os do habitat do hospedeiro seriam importantes nesse processo. Sabidamente, os odores do habitat podem maximizar a resposta dos parasitoides aos compostos exclusivos do hospedeiro, ou então, mascarar a fonte de odor, resultando em um efeito inibitório ou mesmo repelente (AZEEM et al., 2015; BEYAERT et al., 2010; BÜCHEL et al., 2014; FÜRSTENAU et al., 2016; MUMM; HILKER, 2005; SCHRÖDER; HILKER, 2008).

Durante os bioensaios em olfatometria, foi observado que as fêmeas de *H. hebetor* sempre movimentavam as antenas, e eventualmente, exibiam um comportamento de curvatura do abdômen, tanto nos campos contendo o tratamento quanto controle, sugerindo uma grande capacidade de exploração e percepção do ambiente. Ambas atividades são típicas de *H. hebetor* quando na presença de odores de seu hospedeiro (DARWISH; EL-SHAZLY; EL-SHERIF, 2003). Além disso, existem evidências de estruturas sensitivas para estes comportamentos. As fêmeas apresentam sensilas placódeas em suas antenas, que podem ser atribuídas à percepção de cairomônios e odores do ambiente do hospedeiro (DWECK;

GADALLAH, 2008). E ademais, na terceira válvula de seu ovipositor há sensilas tricídeas associadas à mecanorrecepção, provavelmente associadas na resposta para correntes de ar e vibrações durante a busca hospedeira (DWECK; GADALLAH, 2008).

6. CONCLUSÕES

- Existe ao menos um composto químico que constitui o cairomônio proveniente do 'frass' de *A. kuehniella*;
- O cairomônio é polar e pode ser isolado na fração 75% éter pelo fracionamento em coluna de sílica;
- A aeração do 'frass' e dos extratos de lavagem é um método eficiente para extrair o cairomônio e eliminar compostos menos voláteis.

REFERÊNCIAS

- AFSHEEN, S. et al. Differential attraction of parasitoids in relation to specificity of kairomones from herbivores and their by-products. **Insect Science**, v. 15, n. 5, p. 381–397, 2008.
- AKINKUROLERE, R. O. et al. Parasitism and Host-Location Preference in *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae): Role of Refuge, Choice, and Host Instar. **Source Journal of Economic Entomology J. Econ. Entomol**, v. 102, n. 1022, p. 610–615, 2009.
- ALVES, T. J. S. et al. Behavioral studies of the parasitoid *Bracon vulgaris* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Insect Behavior**, v. 28, n. 5, p. 604–617, 2015.
- ATTYGALLE, A. B. Microchemical techniques. In: MILLAR, J. G.; HAYNES, K. F. (Eds.). **Methods in Chemical Ecology: Chemical Methods**. 1. ed. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 207–294.
- AZEEM, M. et al. A fungal metabolite masks the host plant odor for the pine weevil (*Hylobius abietis*). **Fungal Ecology**, v. 13, p. 103–111, 2015.
- BAKKE, A.; KVAMME, T. Kairomone response in *Thanasimus* predators to pheromone components of *Ips typographus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 7, n. 2, p. 305–312, 1981.
- BAKTHAVATSALAM, N.; TANDON, P. L. Kairomones, their optimum concentrations, and application techniques to enhance the parasitization efficiency of *Trichogramma hilonis* Inshii (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Journal of Biological Control**, v. 20, n. 2, p. 169–174, 2006.
- BAYOUMY, H.; KAYDAN, B.; KOZAR, F. Are synthetic pheromone captures predictive of parasitoid densities as a kairomonal attracted tool? **Journal of Entomological and Acarological Research**, v. 43, n. April, p. 23–31, 2011.
- BEKKAOUI, A.; THIBOUT, E. Role of the cocoon of *Acrolepiopsis assectella* (Lep., Hyponomeutidae) in host recognition by the parasitoid *Diadromus pulchellus* (Hym., Ichneumonidae). **Entomophaga**, v. 38, n. 1, p. 101–113, 1993.
- BELLO, J. E.; MCELFFRESH, J. S.; MILLAR, J. G. Isolation and determination of absolute configurations of insect-produced methyl-branched hydrocarbons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 4, p. 1077–82, 2015.

- BENSON, J. F. Intraspecific competition in the population dynamics of *Bracon hebetor* Say. **Source Journal of Animal Ecology**, v. 42, n. 1, p. 105–124, 1973.
- BEYAERT, I. et al. Relevance of resource-indicating key volatiles and habitat odour for insect orientation. **Animal Behaviour**, v. 79, n. 5, p. 1077–1086, 2010.
- BIN, F. et al. Source of an egg kairomone for *Trissolcus basalis*, a parasitoid of *Nezara viridula*. **Physiological Entomology**, v. 18, p. 7–15, 1993.
- BROWER, J. H. et al. Biological Control. In: SUBRAMANYAM, B.; HAGSTRUM, D. W. (Eds.). . **Integrated Management of Insects in Stored Products**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995. p. 223–286.
- BRUCE, T. J. A. et al. Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. **Pest Management Science**, v. 61, p. 1115–1121, 2005.
- BÜCHEL, K. et al. Smelling the tree and the forest: Elm background odours affect egg parasitoid orientation to herbivore induced terpenoids. **BioControl**, v. 59, n. 1, p. 29–43, 2014.
- COOK, S. M.; KHAN, Z. R.; PICKETT, J. A. The use of push-pull strategies in Integrated Pest Management. **Annu. Rev. Entomol**, v. 52, p. 375–400, 2007.
- COTTRELL, T. E. et al. A chemical lure for stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) is used as a kairomone by *Astata occidentalis* (Hymenoptera: Sphecidae). **Florida Entomologist**, v. 97, n. 1, p. 233–237, 2014.
- DARWISH, E.; EL-SHAZLY, M.; EL-SHERIF, H. The choice of probing sites by *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) foraging for *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 39, p. 265–276, 2003.
- DICKE, M.; SABELIS, M. W. Infochemical terminology: Based on cost-benefit analysis rather than origin of infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? **Source: Functional Ecology**, v. 2, n. 2, p. 131–139, 1988.
- DWECK, H. K. M. et al. 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**, v. 36, p. 171–178, 2010.
- DWECK, H. K. M.; GADALLAH, N. S. Description of the antennal sensilla of *Habrobracon Hebetor*. **Biological Control**, v. 53, p. 841–856, 2008.

- DWECK, H. K. M.; GADALLAH, N. S.; DARWISH, E. Structure and sensory equipment of the ovipositor of *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera : Braconidae). **Micron**, v. 39, p. 1255–1261, 2008.
- FATOUROS, N. E. et al. Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. **Behavioral Ecology**, v. 19, n. 3, p. 677–689, 2008.
- FLANDERS, S. E. Biological control of the codling moth. **Journal of Economic Entomology**, v. 20, p. 644, 1927.
- FUKUSHIMA, J.-I.; KUWAHARA, Y.; SUZUKI, T. Isolation and identification of a kairomone responsible for the stinging behavior of *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) from frass of the almond moth *Cadra cautella* Walker. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 5311, p. 3057–3059, 1989.
- FÜRSTENAU, B. et al. Host habitat volatiles enhance the olfactory response of the larval parasitoid *Holepyris sylvanidis* to specifically host-associated cues. v. 0, p. 1–11, 2016.
- GRÉGOIRE, J. C. et al. Orientation of *Rhizophagus grandis* (Coleoptera: Rhizophagidae) to oxygenated monoterpenes in a species-specific predator-prey relationship. **Chemoecology**, v. 3, n. 1, p. 14–18, 1992.
- GUERTIN, D. S. et al. Host-searching and mating in an outbreeding parasitoid wasp. **Ecological Entomology**, v. 21, p. 27–33, 1996.
- HAGSTRUM, D. W.; SMITTLE, B. J. Host finding ability of *Bracon hebetor* and its influence upon adult parasite survival and fecundity. **Environmental Entomology**, v. 6, n. 3, p. 437–439, 1977.
- HARDIE, J. et al. Aphids. In: HARDIE, J.; MINKS, A. K. (Eds.). . **Pheromones of Non-Lepidopteran Insects Associated with Agricultural Plants**. Wallingford: CABI Publishing, 1999. v. 29p. 227–250.
- HARDY, I. C. W. Sex ratio and mating structure in the parasitoid Hymenoptera. **Source: Oikos**, v. 69, n. 1, p. 3–20, 1994.
- HARE, J. D. Bioassay methods with terrestrial invertebrates. In: HAYNES, K. F.; MILLAR, J. G. (Eds.). . **Methods in Chemical Ecology: Bioassay Methods**. 2. ed. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 212–270.
- HEDLUND, K.; VET, L. E. M.; DICKE, M. Generalist and specialist parasitoid strategies of using odours of adult drosophilid flies when searching for larval hosts. **Oikos**, v. 77, n. 3, p. 390–398, 1996.

- HIBBARD, B. E.; BJOSTAD, L. B. Isolation of corn semiochemicals attractive and repellent to western corn rootworm larvae. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, n. 12, p. 3425–3439, 1990.
- HUIGENS, M. E. et al. Chemical espionage on species-specific butterfly anti-aphrodisiacs by hitchhiking *Trichogramma* wasps. **Behavioral Ecology**, v. 21, n. 3, p. 470–478, 2010.
- JONES, R. L. et al. Host-seeking stimulant for parasite of corn earworm: Isolation, identification, and synthesis. **Science**, v. 173, p. 842–843, 1971.
- LARSSON, M. C.; SVENSSON, G. P. Pheromone monitoring of rare and threatened insects: Exploiting a pheromone-kairomone system to estimate prey and predator abundance. **Conservation Biology**, v. 23, n. 6, p. 1516–1525, 2009.
- LEWIS, W. J. et al. Kairomones and their use for management of entomophagous insects: I. Evaluation for increasing rates of parasitization by *Trichogramma* spp. in the field. **Journal of Chemical Ecology**, v. 1, n. 3, p. 343–347, 1975.
- LEWIS, W. J. et al. The role of kairomones and other behavioral chemicals in host finding by parasitic insects. **Behavioral Biology**, v. 16, p. 267–289, 1976a.
- LEWIS, W. J. et al. Production and performance of *Trichogramma* reared on eggs of *Heliothis zea* and other hosts. **Environment Entomology**, v. 5, p. 449–452, 1976b.
- LEWIS, W. J.; JONES, R. L.; SPARKS, A. N. A host-seeking stimulant for the egg parasite, *Trichogramma evanescens*: its source and demonstration of its laboratory and field activity. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 65, p. 1087–1089, 1972.
- LONI, A. et al. Braconinae parasitoids (Hymenoptera, Braconidae) emerged from larvae of *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera, Tortricidae) feeding on *Daphne gnidium* L. **ZooKeys**, v. 587, p. 125–150, 2016.
- MAGRO, S. R.; PARRA, J. R. P. Biologia do ectoparasitóide *Bracon hebetor* Say, 1857 (Hymenoptera: Braconidae) em sete espécies de lepidópteros. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 4, p. 693–698, 2001.
- MANSOUR, R. et al. Using a kairomone-based attracting system to enhance biological control of mealybugs (Hemiptera : Pseudococcidae) by *Anagyrus* sp . near pseudococci (Hymenoptera : Encyrtidae) in Sicilian vineyards In several grape-growing areas around the world , meal. **Journal of Entomological and Acarological Research**, v. 42, n. December, p. 161–170, 2010.

- MANZOOR, A. et al. Biological activity of the toxic peptides from venom of *Bracon hebetor* (Say.) (Hymenoptera: Braconidae). **Pakistan Entomology**, v. 33, n. 2, p. 125–130, 2011.
- MATTIACCI, L.; DICKE, M. Host age discrimination during host location by *Cotesia glomerata*, a larval parasitoid of *Pieris brassicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 76, n. 1, p. 37–48, 1995.
- MEURISSE, N.; COUILLIEN, D.; GRÉGOIRE, J. C. Kairomone traps: A tool for monitoring the invasive spruce bark beetle *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytinae) and its specific predator, *Rhizophagus grandis* (Coleoptera: Monotomidae). **Journal of Applied Ecology**, v. 45, n. 2, p. 537–548, 2008.
- MUMM, R.; HILKER, M. The significance of background odour for an egg parasitoid to detect plants with host eggs. **Chemical Senses**, v. 30, n. 4, p. 337–343, 2005.
- MURAI, T.; IMAI, T.; MAEKAWA, M. Methyl anthranilate as an attractant for two Thrips species and the Thrips parasitoid *Ceranisus mense*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 11, p. 2557–2565, 2000.
- NOLDUS, L. P. J. J.; VAN LENTEREN, J. C. Kairomonal effects on searching for eggs of *Pieris brassicae*, *Pieris rapae* and *Mamestra brassicae* of the parasite *Trichogramma evanescens* Westwood. **Mededelingen Van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent**, v. 48, p. 183–194, 1983.
- NORDLUND, D. A.; LEWIS, W. J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, n. 2, p. 211–220, 1976.
- NORIN, T. Semiochemicals for insect pest management. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, p. 2129–2136, 2007.
- ODE, P. J.; ANTOLIN, M. F.; STRAND, M. R. Brood - mate avoidance in the parasitic wasp *Bracon hebetor* Say. **Animal Behaviour**, v. 49, p. 1239–1248, 1995.
- PARRA, J. R. P. et al. Metodologia de criação de *Anagasta kuehniella* (Zeller 1879) para produção massal de *Trichogramma* spp. **Annals of the Entomological Society of Brazil**, v. 18, p. 403–415, 1989.
- PARRA, J. R. P. et al. Flight response of *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) in a wind tunnel to volatiles associated with infestations of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Biological Control**, v. 6, p. 143–150, 1996.

- PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. Trichogramma in Brazil: Feasibility of use after twenty years of research. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 3, p. 271–281, 2004.
- PAUL, A. V. N.; SINGH, S.; SINGH, A. K. Kairomonal effect of some saturated hydrocarbons on the egg parasitoids, *Trichogramma brasiliensis* (Ashmead) and *Trichogramma exiguum* Pinto, Platner e Oatman (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 126, p. 409–416, 2002.
- PHILLIPS, T. W. Semiochemicals of stored-product insects: Research and applications. **Journal of Stored Products Research**, v. 33, n. 1, p. 17–30, 1997.
- PIEK, T. Site of action of venom of *Microbracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 12, p. 561–568, 1966.
- SCHILDKNECHT, H. Chemical Ecology: A Chapter of Modern Natural Products Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 15, n. 4, p. 214–222, 1976.
- SCHRÖDER, R.; HILKER, M. The Relevance of Background Odor in Resource Location by Insects: A Behavioral Approach. **BioScience**, v. 58, n. 4, p. 308–316, 2008.
- SHONUDA, M. L.; NASR, F. N. Impact of larval-extract (kairomone) of *Ephestia kuehniella* Zell. (Lep., Pyralidae) on the behaviour of the parasitoid *Bracon hebetor* Say. (Hym., Braconidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 122, p. 33–35, 1998.
- SILVERSTEIN, R. M.; RODIN, J. O.; WOOD, D. L. Methodology for isolation and identification of insect pheromones with reference to studies on California five-spined lps. **Journal of Economic Entomology**, v. 60, n. 4, p. 944–949, 1967.
- STEINER, S.; STEIDLE, J. L. M.; RUTHER, J. Host-associated kairomones used for habitat orientation in the parasitoid *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 43, n. 4, p. 587–593, 2007.
- STRAND, M. R. et al. Kairomonal activities of 2-acylcyclohexane-1,3-diones produced by *Ephestia kuehniella* Zeller in eliciting searching behavior by the parasitoid *Bracon hebetor* (Say). **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, p. 1491–1500, 1989.
- TAVARES, J. et al. Produção em massa da *Ephestia kuehniella* (Lep. Pyralidae): Metodologia para a avaliação da produção de ovos e adultos. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Entomologia**, v. 4, n. 2, p. 13–28, 1989.

- TEERLING, C. R. et al. Identification and bioactivity of alarm pheromone in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 4, p. 681–697, 1993.
- TEERLING, C. R.; GILLESPIE, D. R.; BORDEN, J. H. Utilization of western flower thrips alarm pheromone as a prey-finding kairomone by predators. **The Canadian Entomology**, v. 125, p. 431–437, 1993.
- TUMLINSON, J. H.; HEATH, R. R. Structure elucidation of insect pheromones by microanalytical methods. **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, n. 1, p. 87–99, 1976.
- VET, L. E. M.; DICKE, M. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 37, p. 141–72, 1992.
- VET, L. E. M.; GROENEWOLD, A. W. Semiochemicals and learning in parasitoids. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, n. 11, p. 3119–3135, 1990.
- VINSON, S. B. Parasitoid-host relationship. In: BELL, W. J.; CARDE, R. T. (Eds.). **Chemical Ecology of Insects**. Londres: Springer US, 1984. p. 206–233.
- VINSON, S. B. Can semiochemicals alter the use of parasites in IPM programs? **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 27, p. 301–313, 1992.
- ZARBIN, P. H. G. et al. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 263–268, 1999.
- ZHU, G. et al. Chemical investigations of volatile kairomones produced by *Hyphantria cunea* (Drury), a host of the parasitoid *Chouioia cunea* Yang. **Bulletin of Entomological Research**, p. 1–7, 2016.