



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102018076213-3

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102018076213-3

(22) Data do Depósito: 17/12/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 07/07/2020

(51) Classificação Internacional: A01N 31/02; A01P 19/00.

(52) Classificação CPC: A01N 31/02.

(54) Título: FORMULAÇÃO COM ATIVIDADE DE FEROMÔNIO, EFICAZES NO MONITORAMENTO E CONTROLE DE BROCA-DAS-PONTAS DO CAJUEIRO ANTHISTARCHA BINOCULARIS (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE)

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 24464109000148. Endereço: AV. LOURIVAL MELO MOTA, S/N, TABULEIRO DO MARTINS, MACEIÓ, AL, BRASIL(BR), 57072-970, Brasileira

(72) Inventor: ARIANE MORGANA LEAL SOARES; EUZÉBIO GOULART SANTANA; PAULO HENRIQUE BARCELLOS FRANÇA; MERYBETH FERNANDEZ TRIANA; JAKELINE MARIA DOS SANTOS; HENRIQUE FONSECA GOULART; NÍVIA DA SILVA DIAS PINI.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 17/12/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 05/09/2023

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**Formulação com atividade de feromônio, eficazes no monitoramento e controle de broca-das-pontas do cajueiro *Anthistarcha binocularis* (Lepidoptera: Gelechiidae).**”

[001] A presente invenção diz respeito a formulações com atividade de feromônio, eficazes para uso no monitoramento e controle de broca-das-pontas do cajueiro *Anthistarcha binocularis*. A composição da referida formulação contém: (*E*)-6-dodecenol (E6:12OH), Acetato de (*E*)-6- dodecenila (E6:12Act), e atrativo alimentar.

[002] A broca-das-pontas, *A. binocularis* é considerada uma das principais pragas do cajueiro, em sua fase de lagarta prejudica a cultura por broquear a parte lignificada dos ramos florais, onde acontece a passagem de nutrientes pelos vasos condutores, tendo como consequências a interrupção desse fluxo, causando a seca e murcha dos ramos florais e, por conseguinte a não frutificação. Sua presença em áreas de cultivo de caju está diretamente relacionada a danos econômicos na produção dos frutos.

[003] Tem preferência alimentar pelo período de floração do caju, realizando a oviposição na porção terminal das inflorescências. As lagartas, recém eclodidas, penetram no tecido vegetal e alimentam-se da parte lignificada do ramo, impedindo a passagem de nutrientes para as inflorescências (BLEICHER, E.; MELO, Q. M. S. **Artrópodes associados ao cajueiro no Brasil**. 2ª Ed., Fortaleza: EMBRAPA – CNPAT, 35p., 1996). Dessa forma, surgem os sintomas característicos de ataque dessa praga, que são: murcha seguida de seca das inflorescências, até a quebra do ramo no local do orifício de saída do inseto adulto, na forma de uma mariposa pequena acinzentada, com asas esbranquiçadas (MESQUITA, A. L. M. **Caju: principais pragas**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/caju/arvore/CONT000fyra9xch02wx5ok0pvo4k37fj97ni.html>. Acesso em: 03 mai. 2015).

[004] Em função da fenologia do cajueiro a maior ocorrência de broca das pontas no campo vai do início do florescimento, onde ocorre a formação de panículas, até a colheita, estando também presente em todas as fases de

formação dos frutos por ainda ocorrer formação de novas inflorescências até o final do ciclo de frutificação. No Ceará, estes períodos de floração e frutificação duram nove meses iniciando em maio e com término em janeiro (MESQUITA, A. L. M. M. et al. Controle da traça-da-castanha com produtos à base de óleos essenciais e hidrolatos. **Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical**, 2008. 3p. (Embrapa Agroindústria Tropical, Comunicado técnico, 135) Disponível em: http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/cot_135.pdf. Acesso em: 13 jul. 2015).

[005] No Brasil a área plantada atualmente é de 651.666 hectares, tendo uma produção de castanha de caju de 237.135 toneladas, com um rendimento médio de 368 kg/ha, a participação do nordeste na produção de castanha de caju brasileira representa algo em torno de 95%. Os maiores produtores de castanha de caju no nordeste do Brasil são Ceará, Rio Grande do Norte, Piauí e Bahia, além da região nordeste, apenas o Pará na região norte, representa significativamente na produção de castanha do país (**CONAB. Conjuntura mensal – Castanha de Caju. 2016, 5p. Disponível em:** http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_05_15_18_01_13_castanhadecajuabril.pdf. **Acesso em: 15 jul. 2016.; IBGE. Produção Agrícola, 2016).**

PROBLEMA QUE A INVENÇÃO SE PROPOE A RESOLVER

[006] A broca das pontas do cajueiro *Anthistarcha binocularis*, é um dos principais insetos pragas que atacam a cultura do cajueiro, interferindo diretamente na produção do fruto por área plantada. Os danos causados pela lagarta nos ramos de inflorescência do cajueiro, impedem a passagem de seiva, interrompendo o desenvolvimento do ramo floral ou causando a morte deste, inviabilizando assim a produção dos frutos.

[007] O cajueiro é uma espécie nativa da costa norte do Brasil adaptada a um amplo espectro ecológico. Por seu interesse comercial ganhou força na produção por países asiáticos, africanos, e sul americanos como por exemplo, Vietnã, Índia, Nigéria, Costa do Marfim, Peru e Brasil, (DELGADO, C;

COUTURIER, G. Principaux insectes nuisibles à l'anacardier en Amazonie peruvienne. Données préliminaires. **Fruits**, vol. 69, n.4, p. 293-302, 2014). 198 países produzem castanha de caju, no mundo, estima-se que a cajucultura ocupe uma área de 3,39 milhões de hectares no mundo, com uma produção de 3,1 milhões de toneladas de castanha de caju (FAOSTAT - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITEDNATIONS. Key statistics of food and agriculture external trade. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>. Acesso em: 15 jul. 2016).

[008] Os principais produtos gerados da cajucultura advêm do processamento da castanha em casca (fruto verdadeiro), resultando a Amêndoa de Castanha-de-Caju (ACC) e o Líquido da Castanha-de-Caju (LCC), ambos de grande valor comercial. Do pedúnculo, são produzidas as bebidas e venda do fruto in natura (SOUZA FILHO, H. M. et al. Barreiras às novas formas de coordenação no agrossistema do caju na região nordeste, Brasil. **Gest. Prod.**, v. 17, n. 2, p. 229-244, 2010).

[009] A presente invenção se propõe a resolver o problema enfrentado pelos produtores de frutos de caju, no que se refere ao ataque da praga em questão, a qual vem causando sérios prejuízos em vários estados brasileiros, principalmente no Nordeste.

CAMPO DE ATUAÇÃO

[010] A presente patente atuará na área de agronomia, agricultura, fitossanidade e manejo de inseto praga em cultivos de caju, com um método efetivo para o monitoramento e controle da espécie *Anthistarcha binocularis*. Utilizando feromônio fêmea específico, que atua interferindo o comportamento sexual da espécie e diminuindo assim sua população. Junto ao Manejo Integrado de Pragas o controle comportamental, utilizando feromônio, pode ser associado a outros métodos já utilizados em plantios de caju, e ter aplicação não somente no Brasil, como em todos os centros de cultivo no mundo com a incidência da praga.

[011] O uso dos semioquímicos tem se mostrado uma excelente ferramenta no monitoramento e controle de insetos-pragas sem risco ao ambiente, por ser intraespecífico, contribuindo positivamente para produção agrícola livre de produtos fitossanitários que gerem resíduos tóxicos a alimentação humana.

ESTADO DA TÉCNICA

[012] O cajueiro é uma planta perene importante no Brasil, muito cultivada no nordeste brasileiro, com relevância na produção e exportação de castanha de caju. *Anthistarcha binocularis* Meyrick, 1929 (Lepidoptera: Gelechiidae), é considerada uma das principais pragas da cultura no país, pelo fato de a alimentação das lagartas interromper a passagem da seiva para os ramos florais, causando murcha e morte destes e impedindo assim o desenvolvimento dos frutos. O hábito endofítico e noturno da praga dificulta o controle.

[013] A espécie *A. binocularis* é uma mariposa, pertencente a ordem Gelechiidae, e os insetos adultos têm preferência noturna por hábitos de acasalamento e oviposição. Nesta família vários são insetos agrícolas importantes, incluindo o bollworm rosa *Pectinophora gossypiella* (Saund., 1844), uma ameaça para os cultivadores de algodão em todo o mundo; a traça dos grãos *Sitotroga cerealella* (Oliv., 1819), que se alimenta de grãos armazenados; a mariposa dos tubérculos de batata *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873); e muitas outras pragas minadoras (RESH, V. H.; CARDÉ, R. T. **Encyclopedia of insects**. Edit: Academic Press, second edition, 2009, p.576).

[014] As recomendações para o controle de *A. binocularis* são principalmente pela aplicação de inseticidas organofosforados (malathion e fenitrothion), produtos registrados no Ministério da Agricultura, no período de floração e início da frutificação e por tratamentos culturais, como a poda e queima dos ramos atacados (MELO, Q.M.S. (Ed.). **Caju: fitossanidade**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. (Frutas do Brasil, 26)). Mas a eficiência desses inseticidas, que em sua maioria, tem modo de ação por contato e ingestão, é dificultada pelo hábito endofítico da praga, e a pulverização desses produtos não conseguem atingir o alvo.

[015] Na busca por alternativas menos agressivas ao meio ambiente, estudos com pulverização do cajueiro com inseticidas naturais à base de óleos essenciais e hidrolatos mostrou-se eficiente na prevenção do ataque da praga (MESQUITA, A. L. M. M. et al. Controle da traça-da-castanha com produtos à base de óleos essenciais e hidrolatos. **Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical**, 2008. 3p. (Embrapa Agroindústria Tropical, Comunicado técnico, 135) Disponível em: http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/cot_135.pdf. Acesso em: 13 mar., 2015.)

[016] Inimigos naturais de *A. binocularis* foram descritos por Mesquita e colaboradores (1998), como *Bracon* sp. (Hymenoptera: Braconidae) e fungos do gênero *Acremonium*, encontrados em lagartas dessa espécie. *Oecophylla longinoda* Latreille, 1802 (Hymenoptera: Formicidae) foi usado para reduzir a incidência de pragas em caju na África segundo (ANATO, F. M. et al. Reducing losses inflicted by insect pests on cashew, using weaver ants as a biological control agent. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 17, p. 285–291, 2015). Estes estudos mostram alternativas que podem ser usados em conjunto a outras formas de controle menos agressivas ao agroecossistema da cultura do cajueiro anão precoce para diminuição da incidência de pragas.

[017] Ainda não há na literatura dados sobre a utilização de semioquímicos no manejo de *A. binocularis* em cajueiros. No entanto, os feromônios sexuais, compostos responsáveis pela atração química intraespecífica para fins de reprodução, podem ser utilizados em armadilhas como instrumento de detecção e captura de insetos. A facilidade de utilização, a especificidade, o caráter não poluente e a compatibilidade com outros métodos de controle são vantagens da utilização de feromônios no manejo integrado de pragas (PARRA-PEDRAZZOLLI, A. L. Isolamento, identificação, síntese e avaliação de campo do feromônio sexual do minador-dos-citros, *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera: Gracillariidae). 2006. 81f. **Tese** (Doutorado em Ciências: Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006).

[018] Grande parte das pesquisas envolvendo feromônios sexuais no mundo são de lepidópteros principalmente de insetos que possuam alguma importância econômica. E, em sua maioria, são resultados de misturas de compostos ativos em diferentes proporções (LEY, H.; VICKERS, N. Central processing of natural odors mixtures in insects. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.34, n.7, p. 915-927, 2008).

[019] Alguns exemplos de uso de feromônios em pragas de grande importância agrícola podemos citar para as pragas *Helicoverpa armigera*, uma praga desfolhadora de culturas em geral, tendo na composição o (Z)-11-Hexadecenal + (Z)-9-Hexadecenal; *Spodoptera frugiperda*, lagarta do cartucho do milho, (Z)-9-tetradecenila + (Z)-7-dodecenila + (Z)-11-hexadecenila; e *Tuta absoluta*, traça do tomateiro, composição (E,Z,Z)-3,8,11-tetradecatrienyl acetate + (E,Z,Z)-3,8,11-acetato de tetradecatrienila.

[020] Feromônios sexuais já foram descritos em mais de 70 espécies de 40 gêneros dessa família e caracterizam-se geralmente como acetatos mono ou poli-insaturados com 10 a 18 átomos de carbono (EL-SAYED, A.M. **The Pherobase**: Database of Pheromones and Semiochemicals. Disponível em: <http://www.pherobase.com>, 2012. Acesso em: 28 jul. 2017).

[021] Alguns exemplos desses compostos já relatados para insetos da família Gelechiidae são acetato de (Z)-3- dodecenila (Z3-12:Act) e acetato de (Z)-5-tetradecenila (Z5-14:Act) são componentes do feromônio sexual de *Monochroa divisella* Douglas, 1850 praga chave da cultura de *Iris* spp. (Iridaceae), importante gênero de flores ornamentais cultivadas no mundo (TABATA, J.; KUBOTA, S. Sex pheromone of the iris gelechiid moth *Monochroa divisella*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 164, p. 113–119, 2017). O feromônio sexual de *Stathmopoda auriferella* Walker, 1864 é o acetato de (E)-5-hexadecenila (E5-16:OAc) (YANG, C. Y.; CHOI, K. S.; CHO, M. R. (E)-5-Hexadecenyl Acetate: A Novel Moth Sex Pheromone Component From *Stathmopoda auriferella*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p.555–558, 2013).

[022] Em busca utilizando as bases WIPO, Patent Inspiration, LATIPAT e Spacenet, duas patentes foram localizadas com busca pelo termo “Pheromone Gelechiidae”, ambas com classificação A01N 37/00 no IPC, são elas: a utilização dos compostos (*E*)-5-decenilacetato (*E*5-10: OAc) e (*E*)-5-decenol (*E*5-10: OH) e um sinal sônico compreendendo uma ou mais frequências em todas as combinações e proporções possíveis selecionadas do grupo consistindo de: 61 ± 10 Hz; 5 ± 5 kHz; 12 ± 5 kHz, como formas atrativas de machos de *Anarsia lineatella* Zeller, conhecida como broca do galho do Pêssego, depósito de patente número WO2007053926A1. E a identificação do composto acetato de trans-4, cis-7-tridecadienilo como feromônio sexual de *Phthorimea operculella*, larva do tubérculo da batata, depósito de patente número US4010255A.

DESCRIÇÃO DA ABORDAGEM DO PROBLEMA TÉCNICO

[023] Tecnicamente a condução do manejo fitossanitários da broca das pontas do cajueiro é dificultada pelo hábito endofítico da praga, passando toda a fase de lagarta, fase esta que caracteriza o período mais crítico de danos a formação da inflorescência pela alimentação da lagarta, alojada no ramo, dificultando assim o uso do controle químico com a pulverização de agrotóxicos por não haver um contato direto do ingrediente ativo com a praga e por se tratar de uma planta perene a translocação do produto demorar até alcançar toda a planta. Outra forma seria o uso de controle cultural com podas das inflorescências atacadas, mas estas reduziriam o standart de flores no campo e em consequência a produção de frutos, estas devem ser realizadas ao fazer a limpeza de ramos improdutivos após a colheita, como forma preventiva.

[024] Dessa forma devido as dificuldade de controle quando relacionamos hábitos da praga e fenologia da planta, o uso de feromônio é uma forma de capturar insetos adultos e diminuir sua população no campo, além de facilitar quanto ao monitoramento e o grau de infestação que a praga encontra-se na área, por ser um produto intraespecífico não gerando resíduo químico ao ambiente. Sendo assim, a indicação de um feromônio é uma alternativa viável para uso no manejo integrado de pragas da cultura do cajueiro.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[025] Figura 01. Cromatograma de íons totais do extrato da glândula sexual de *Anthistarcha binocularis* Meyrick, 1929. Indicação de todos os compostos com características feromonais encontrados no extrato de glândula sexual de broca das pontas do cajueiro. Numerados de acordo com a tabela 1.

[026] Figura 02. Cromatogramas de confirmações de compostos saturados em eletroantenografia presentes no extrato de *Anthistarcha binocularis* Meyrick, 1929 com padrões sintéticos¹. Comparações dos compostos identificados em extratos de glândulas descritos na Tabela 1, e confirmações com padrões sintéticos. ¹ Linha preta representa mistura sintética dos padrões identificados no extrato e linha rosa representa cromatografia do extrato de glândulas de *A. binocularis*. (1 – acetato de dodecanila; 2 – acetato de hexadecanila; 3 – octadecanol; 4 – acetato heptadecanila; 5 – acetato de octadecanila).

[027] Figura 03. Cromatogramas de confirmações de compostos insaturados presentes no extrato de *Anthistarcha binocularis* Meyrick, 1929 com padrões sintéticos ¹. Comparações dos compostos identificados em extratos de glândulas descritos na Tabela 1, e confirmações com padrões sintéticos. ¹ Linha cor preta representa mistura sintética dos padrões identificados no extrato e linha rosa representa cromatografia do extrato de glândulas de *A. binocularis*. (1: (E)-6-dodecenol; 2 – acetato de (E) -6- dodecenila).

[028] Figura 04 - Resposta eletroantenográfica de machos de *A. binocularis* a extratos de glândulas sexuais de fêmeas. A figura mostra o estímulo eletroantenográfico quando as sensílas presentes nas antenas de machos reconhecem um odor característico, no caso compostos do feromônio sexual produzido e liberado pela fêmea para atração do macho.

[029] Figura 05 - “Puffs” com padrões sintéticos dos compostos ativos em eletroantenografia em duas configurações estruturais das moléculas. Estímulo eletroantenográfico compulsivo produzido pela sensílas presentes na antena do macho quando exposta a uma injeção de ar com compostos conhecidos. Foram testados dois compostos em duas configurações, e comparados ao hexano,

solvente utilizado para diluições. Os compostos com configuração *E* tiveram maior resposta quando comparado aos demais tratamentos.

[030] Figura 06 – Teste de confirmação de atratividade sexual por compostos feromônais sintéticos em armadilhas com diferentes concentrações e configurações dos compostos, observadas durante 5 dias após instalação, em plantação de caju na cidade de Amarante, Piauí. O teste foi realizado no período de floração de caju no estado do Piauí e com infestação da praga na área em estudo. A área subdividida em blocos casualizados para oferecer as mesmas condições a todos os tratamentos. Foi observado que apenas nas armadilhas contendo a mistura feromonal na configuração *E* foi atrativa para machos de *Anthistarcha binocularis*.

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA

[031] A criação dos insetos foi realizada no Laboratório de Pesquisas Químicas em Recursos Naturais (LPqRN), do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas. Os insetos na fase de lagarta e pupa foram coletados na Fazenda Daniel, localizada em Boca da Mata – AL, a fazenda trabalha com clones de cajueiro anão precoce, em 10 hectares, na sua maioria a variedade CCP 76.E na Fazenda Banzeiro localizada no município de Picos – PI, onde a predominância é pelo cultivo da variedade CCP 76. As coletas foram realizadas de Abril a Outubro de 2015, no estado de Alagoas, e no mês de Julho de 2015 no estado do Piauí.

[032] Após as coletas as pupas foram sexadas e individualizadas em tubos (10 cm altura e 2,5 de diâmetro), o dimorfismo caracteriza-se por diferenças morfológicas na porção terminal do abdômen, machos apresentando reentrância no penúltimo segmento abdominal e duas reentrâncias no antepenúltimo segmento nas fêmeas. Os adultos foram alimentados com solução de sacarose a 10%. Após uso foram sacrificados.

[033] A sala de criação recebeu iluminação de 3,5 W/m², com fotoperíodo de 12 horas de fotofase e 12h de escotofase, o sistema de iluminação era desligado

automaticamente. As condições climáticas tiveram variações entre 25 a 27°C de temperatura e umidade acima de 70%.

[034] **Extração do feromônio sexual** - Foi observado que as fêmeas em momento de chamamento expunham a glândula sexual na porção final do abdômen, então ao iniciarem esse período os insetos foram paralisados, por resfriamento em freezer a -20°C, para localização da glândula sexual. Para *A. binocularis* o momento de chamamento se deu próximo a quinta hora da escotofase, a glândula após a excisão foi colocada em vial com hexano bidestilado (grau HPLC) e deixado por 30 minutos, logo após o sobrenadante removido, colocado em outro vial e acondicionado em freezer a -20°C para análises posteriores.

[035] Foram utilizadas fêmeas de 24h após a emergência para extração das glândulas, sendo utilizado 15uL por glândula para extração dos compostos, num total de 200 glândulas amostradas.

[036] **Análises químicas** - Para análise dos extratos foi utilizado um espectrometro de massas (SHIMADZU, QB 2010 Ultra) acoplado à cromatografo gasoso, equipado com coluna capilar DB-5de 30m (0.25um di, 0.25mm Restek®), quadrupolo com impacto eletrônico (70eV), com fase estacionária (5% - fenil) – metilpolisiloxane. Foi utilizado o gás hélio para arraste com fluxo da coluna de 1,10 mL/min constante. O método empregado no equipamento para análise dos extratos iniciou com aquecimento a 50°C por 5 min do forno, sendo aquecido a 8°C/min até atingir 240°C e mantido esta temperatura por 10 minutos.

[037] Também foi utilizado CG – DIC, equipado com coluna capilar RTX-5 de 30m (0.25µm di, 0.25mm Restek®) (SHIMADZU, modelo GC-2010), com fluxo de 1,10 mL/min constante, no mesmo método empregado para o CG/EM. para cálculo do Índice de Kovats (IK) e quantificação dos compostos no extrato.

[038] A identificação dos compostos foi realizada através de análises individuais dos espectros de massas, análise da fragmentação dos compostos e comparação entre os dados adquiridos pelo software do CG/EM, comparado com bancos de dados divulgados como pherobase e nist, com o Índice de Kovats calculado para cada composto e comparados com a literatura. Para cálculo de

IK foi usado padrão de n-alcanos de C7-C30 no mesmo método de análise para os extratos, e para a normalização de áreas dos compostos na amostra, utilizando tetradecanol como padrão interno para quantificação.

[039] As reações de acetilação foram feitas a partir do método de (YADAV, J. S., REDDY, E. J., Synthesis of (3*E*, 5*Z*)-3,5-Dodecadienylacetate, the Sex Pheromone of *Phtheochroa cranaodes* (Lepidoptera :Tortricidae). **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 64, p. 1726-1728, 2000). A síntese dos compostos foi realizada para confirmar as estruturas propostas. A figura 15 é uma representação dos processos de identificação de feromônio sexual em mariposas.

[040] A determinação da posição das duplas ligações em compostos insaturados presentes nos extratos de glândulas foi feita através da reação de derivatização com DMDS (BUSER, H. R. et al. Determination of double bond position in mono-unsaturated acetates by mass spectrometry of dimethyl disulfide adducts. **Analytical Chemistry**, v.55, p. 818-822, 1983). O extrato utilizado para derivatização foi constituído de 7 glândulas, adsorvidas em 15 µL de hexano cada glândula. A derivatização obtida foi analisada em CG/EM com coluna cromatográfica DB-5, nas mesmas condições utilizadas para análise dos extratos.

[041] **Analises eletroantenográficas** - A eletroantenografia é um método utilizado para caracterizar os componentes químicos ativos ao inseto, fornecendo quais compostos apresentam atividade. As antenas foram retiradas de machos vivos com 1 e 2 dias de idade e fixadas em eletrodos de Ag utilizando gel condutor. Foram utilizadas 20 antenas de 20 insetos, uma por vez.

[042] Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa equipada com coluna RTX-5 acoplada a um detector eletroantenográfico (CG/EAD). O método utilizado para análises no CG/EAD foi, aquecimento inicial a 50°C por 1 min, sendo aquecido 15°C/min até atingir 300°C e mantido esta temperatura por 5 minutos, o tempo total de corrida foi de 22,67 minutos. Esse tempo de corrida é reduzido para que não ocorra a morte da antena durante a análise. Foi testado

os extratos de glândulas sexuais de fêmeas virgens em antenas de machos e de fêmeas e utilizado o programa EAGPro 2008 para análises.

[043] Após a identificação dos compostos ativos e sínteses desses compostos, foram feitos testes “puffs”, com esses padrões sintéticos, utilizou-se antenas de machos após 24 horas de emergidos. Foram testados os compostos 6–dodecenol e acetato de 6-dodecenila nos isômeros *E* e *Z*, na concentração de 50 ppm cada composto, e hexano, solvente utilizado nas soluções, como tratamento controle. Análises de respostas foram feitas através da medição de intensidade dos estímulos no programa EAGPro 2008.

[044] Em um pedaço de papel filtro (1,0 x 0,25 cm) foi adicionado 10 µL de cada solução, em seguida o papel filtro foi inserido em uma pipeta de Pasteur. A pipeta era inserida ao sistema gerador de pulsos do equipamento, programado para gerar um “puff” a 5mL/min, durante 0,3s. Cada solução foi testada uma vez e esperado um minuto para despolarização da antena para prosseguir o experimento.

[045] Análises individuais dos extratos deu-se, através do cálculo de IK, e comparação com extratos já injetados e analisados no CG/DIC e CG/EM.

[046] **Bioensaio de atratividade em campo** – para confirmação de qual dos isômeros teria atividade atrativa em campo, estes foram testados em uma área de cultivo de caju no município de Amarante, no estado do Piauí.

[047] Foram utilizadas armadilhas tipos deltas com piso impregnado de cola, local onde foi fixado o septo impregnado com a mistura feromonal. As armadilhas foram fixadas em galhos nas extremidades das copas das árvores, com arames, a aproximadamente dois metros de altura do chão. O experimento foi delineado em blocos casualizados contendo cinco tratamentos, quatro contendo misturas feromonais e um contendo hexano, solvente utilizado nas diluições, como tratamento controle, em cinco repetições e avaliados todos os dias após a instalação até o quinto dia. Os tratamentos foram:

[048] T1 – Z6:12OH e Z6:12Act dosagem 100ug

[049] T2 – Z6:12OH e Z6:12Act dosagem 250ug

[050] T3 – E6:12OH e E6:12Act dosagem 100ug

[051] T4 – E6:12OH e E6:12Act dosagem 250ug

[052] T6 – Hexano (250uL)

[053] As armadilhas foram dispostas de forma a ficarem 100 metros de distância uma da outra, visto que o plantio era formado por plantas de grande porte.

RESULTADOS OBTIDOS

[054] **Identificação do feromônio sexual de *A. binocularis*** - Os compostos obtidos em extratos de glândulas sexuais de fêmeas coletadas nos estados de Alagoas e Piauí, analisados em CG/EM, foram acetatos, álcoois e ésteres, de 9 a 22 carbonos saturados e insaturados. Foram identificados como prováveis componentes do feromônio de broca das pontas 7 compostos (Figura 1, Tabela 1) presentes nos extratos, que foram confirmados por análises de fragmentação molecular, análises por Índice de Kovats, padrões sintéticos e confirmação com dados nas bases Pherobase e Nist.

Tabela 1. Composição química de extratos da glândula sexual de *Anthistarcha binocularis* Meyrick, 1929 coletadas nos estados de Alagoas e Piauí.

Pico	IK	Composto	MW	Fórmulas	Porcentagem na isca
1	1459	(E)-6-Dodecenol	184	C ₁₂ H ₂₄ O	0 a 100%
2	1593	Acetato de (E)-6-dodecenila	226	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	0 a 100%
3	1605	Acetato de dodecanila	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	0 a 100%
4	2005	Acetato de hexadecanila	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	0 a 100%
5	2082	Octadecanol	270	C ₁₈ H ₃₈ O	0 a 100%
6	2105	Acetato de heptadecanila	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	0 a 100%
7	2205	Acetato de octadecanila	312	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	0 a 100%

[055] A confirmação desses compostos foi através de padrões sintéticos adquiridos ou sintetizados no LPqRN. As figuras 2 e 3 mostram os cromatogramas sobrepostos, sendo possível observar os picos com padrões

sintéticos coincidindo com o mesmo tempo de retenção dos compostos identificados na amostra com extrato de glândulas.

[056] Confirmação da posição da dupla ligação dos composto foi realizada pela derivatização usando DMDS em uma amostra com 7 glândulas (15 µL/glândula). Dois compostos apresentaram fragmentações, de acordo com análises dos espectros de massas, indicando os íons M^+ (correspondente ao peso molecular dos compostos). O dodecenol, apresentou perda de uma molécula de água ($M^+ - 18$) (Composto 1 da Tabela 1), fragmentação característica de álcoois. O acetato de dodecenila apresentou perda do fragmento $M^+ - 60$, característicos de acetatos. A análise dos espectros de massas confirma a posição da dupla ligação no carbono 6 pela presença dos picos m/z 131 e 147 para o álcool e m/z 131 e 189 para o acetato.

[057] **Análises eletroantenográficas** - O 6-12:OH e o 6-12:Act apresentaram atividade quando testados nas antenas de machos de *A. binocularis*. Comparações com padrões sintéticos de configuração *Z* e *E* por cromatografia confirmaram a configuração (*E*) da dupla ligação nas duas moléculas, sendo assim chegou-se a identificação do (*E*)-6-dodecenol e acetato de (*E*)-6-dodecenila como compostos bioativos aos machos de *A. binocularis* em eletroantenografia (Figura 4).

[058] Identificados os compostos bioativos de fêmeas da espécie, foi realizada a síntese desses compostos e testados em “puffs”. Os “puffs” foram realizados com as moléculas de configuração *E* e *Z* para real confirmação da configuração da molécula ativa. Os compostos *E*-6:12OH e o *E*-6:12Act foram os que apresentaram maior intensidade de diferença potencial em relação ao isômero *Z* e ao hexano testado como tratamento controle, na concentração de 50 ppm. Mesmo apresentando maior intensidade, houve resposta para os compostos do isômero *Z* quando comprado ao tratamento apenas com hexano, então testou-se as duas formulações no campo para verificar a real atratividade dos compostos a machos da espécie *A. binocularis* (Tabela 2).

[059] **Bioensaio de atratividade em campo** – Confirmou-se que a configuração *E*-6:12OH e o *E*-6:12Act foram os tratamentos que apresentaram

atratividade a machos de *A. binocularis* em cultivo de caju com infestação da praga. Também foi observado que na dosagem de 250ug foram coletados mais insetos do que na dosagem de 100ug ao longo dos 5 dias avaliados, nos demais tratamentos não foram coletados nenhum inseto praga (Figura 5). Dessa forma, afirma-se que (*E*)-6-dodecenol e acetato de (*E*)-6-dodecenila são compostos com atratividade sexual de *A. binocularis*, podendo serem utilizados em misturas feromonais para uso no monitoramento e controle da praga.

VANTAGENS DA PATENTE

[060] As técnicas existentes para o controle de broca das pontas do cajueiro consistem na aplicação de inseticidas, organofosforados na maioria, e podas de ramos atacados. A pulverização com inseticidas além de ser uma técnica com alta toxicidade ao ambiente e ao homem, não é eficaz no controle da praga que tem o hábito de alojar-se no ramo floral, consumindo a parte lignificada de condução de seivas e interrompendo assim o fluxo de nutrientes para as flores. As podas diminuem a quantidade de flores da área e consequentemente a produção, além de ser um serviço oneroso, dependente de muita mão de obra, dependendo do tamanho a área.

[061] O uso de feromônio, para monitoramento e controle, é uma técnica com vantagem ecológica dominante com relação as demais, pela atuação específica a praga alvo, não contaminando os demais organismos. A utilização de armadilhas compostas por um septo impregnado com a mistura feromonal e um piso adesivo, possui a característica atrai e mata, que pode ser utilizada para coleta massal, em caso de áreas com infestações acima do nível de dano econômico, e para monitoramento constante da praga na área.

[062] Outra vantagem é a persistência da atividade biológica do produto no campo por muito mais tempo, diminuindo os custos com aplicações sucessivas e mão de obra. O uso de armadilhas com feromônio sintético, permite a captura de dos insetos-alvo, provocando a interrupção no acasalamento, impedindo a oviposição e consequentemente a redução da geração seguinte de *A. binocularis*.

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação de Feromônio Sexual, eficaz no controle da broca das pontas do cajueiro, *Anthistarcha binocularis* (Lepidoptera: Gelechiidae), **caracterizado por** compreenderem uma combinação de: (E)-6-dodecenol e acetato de (E)-6-dodecenila.
2. Formulação de Feromônio Sexual, eficaz no controle da broca das pontas do cajueiro, *Anthistarcha binocularis* (Lepidoptera: Gelechiidae), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a razão entre os componentes (E)-6-dodecenol e acetato de (E)-6-dodecenila na proporção 1:50, respectivamente.
3. Formulação de Feromônio Sexual, eficaz no controle da broca das pontas do cajueiro, *Anthistarcha binocularis* (Lepidoptera: Gelechiidae), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** se apresentarem na forma líquida, seja na forma em suspensão ou gel, ou, na forma sólida por se apresentarem micronizada em pó ou em grânulos.
4. Formulação de Feromônio Sexual, eficaz no controle da broca das pontas do cajueiro, *Anthistarcha binocularis* (Lepidoptera: Gelechiidae), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** serem usadas com ou sem fago estimulantes provenientes do cajueiro, extratos de plantas e suas combinações.
5. Formulação de Feromônio Sexual, eficaz no controle da broca das pontas do cajueiro, *Anthistarcha binocularis* (Lepidoptera: Gelechiidae), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** poderem compreender um ou mais inseticidas químicos, ou inseticidas biológicos, à exemplo, toxinas como piretrinas naturais, ou combinações dos mesmos.

6. Formulação de Feromônio Sexual, eficaz no controle da broca das pontas do cajueiro, *Anthistarcha binocularis* (Lepidoptera: Gelechiidae), de acordo com a reivindicação 1 a 5, **caracterizado por** utilizarem a composição inserida em armadilhas (armadilhas iscadas) distribuídas nos plantios visando a captura desta espécie.

DESENHOS

Figura 01

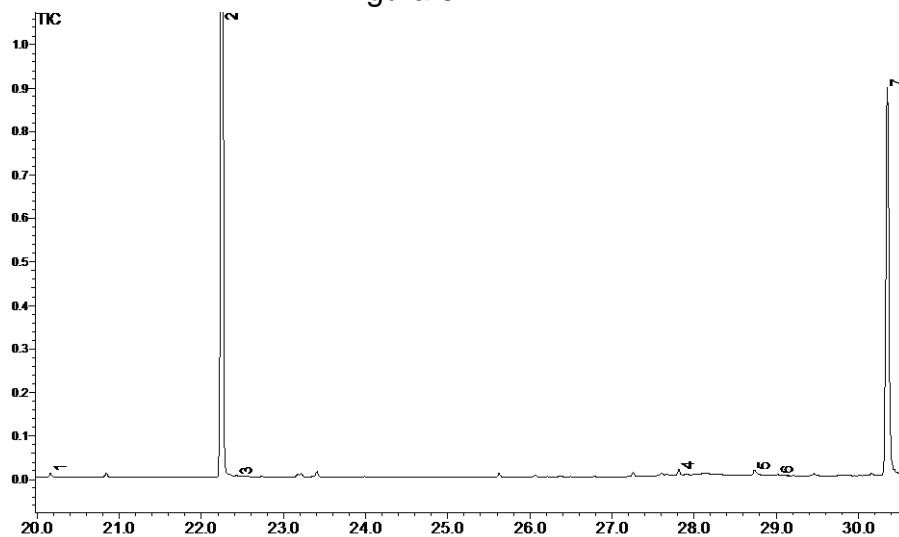


Figura 02

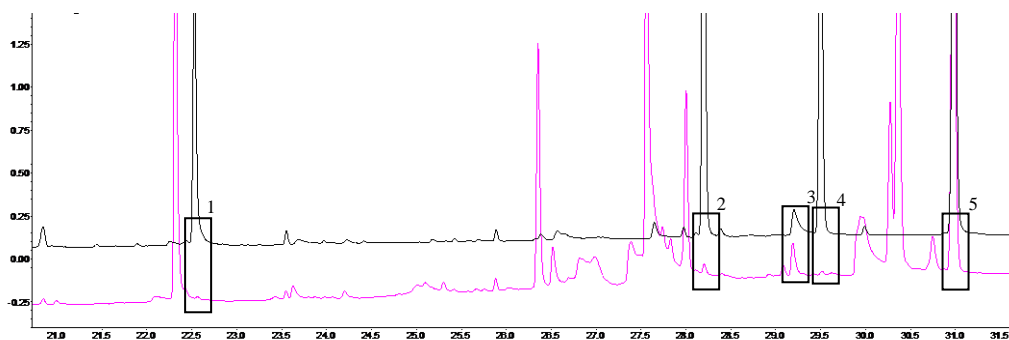


Figura 03

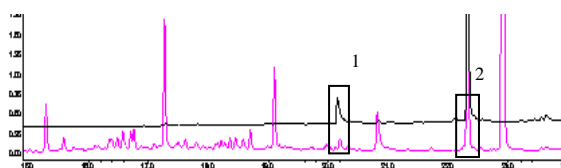


Figura 04

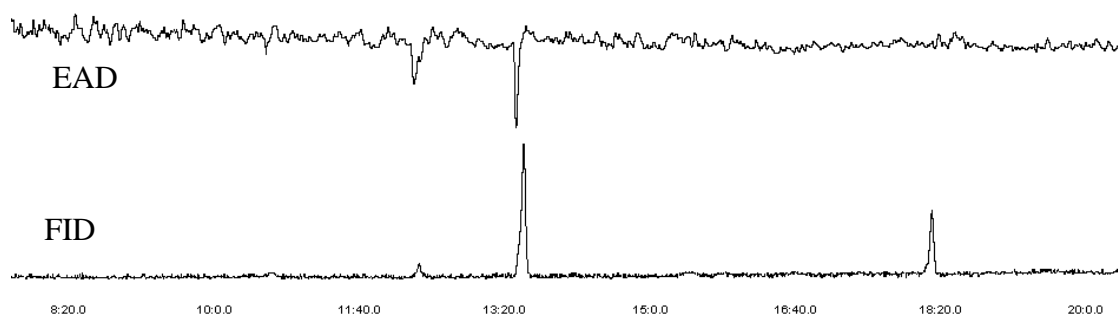


Figura 05

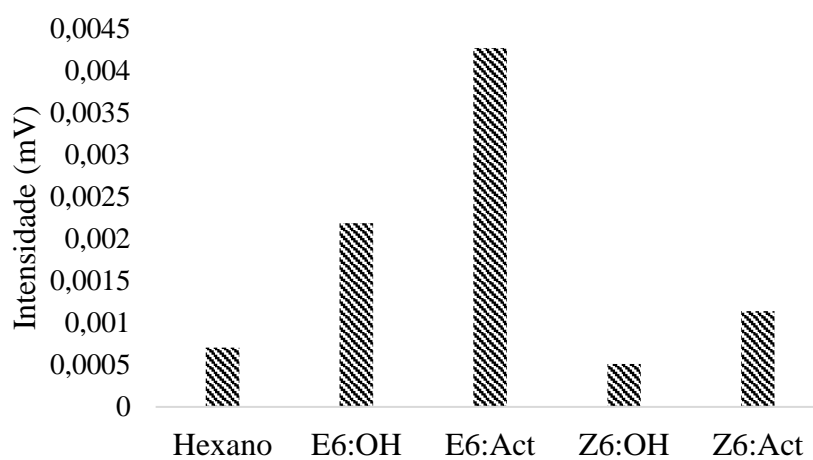


Figura 06

