



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

CARTA PATENTE Nº BR 102018000016-0

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 102018000016-0

(22) Data do Depósito: 02/01/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 16/07/2019

(51) Classificação Internacional: A01N 31/02; A01N 27/00; A01P 7/04.

(52) Classificação CPC: A01N 31/02; A01N 27/00.

(54) Título: FORMULAÇÃO ATRAENTE COM ATIVIDADE FEROMONAL PARA FÊMEAS DA MOSCA DAS FRUTAS A. OBLIQUA (DIPTERA: TEPHRITIDAE)

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, Pessoa Jurídica. Endereço: AV. LOURIVAL MELO MOTA, S/N, TABULEIRO DO MARTINS, MACEIÓ, AL, BRASIL(BR), 57072-970, Brasileira

(72) Inventor: NATHALY COSTA DE AQUINO; LUANA LIMA FERREIRA; CLAUDINETE DOS SANTOS SILVA; FABIANE CAXICO DE ABREU GALDINO; ADRIANA DE LIMA MENDONÇA; RUTH RUFINO DO NASCIMENTO; RAPHAEL DE FARIAZ TAVARES; PAULO MILET-PINHEIRO; DANIELA MARIA DO AMARAL FERRAZ NAVARRO.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 02/01/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 18/07/2023

Assinado digitalmente por:
Alexandre Dantas Rodrigues

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

RELATÓRIO DESCritivo DA PATENTE DE INVENÇÃO PARA “Formulação atraente com atividade feromonal para fêmeas da mosca das frutas *A. obliqua* (Diptera: Tephritidae)”

[001] A presente invenção refere-se às formulações com atividade feromonal a partir de compostos voláteis liberados por machos da mosca das frutas *Anastrepha obliqua*, eficazes no controle desse inseto praga. Em uma primeira concretização, a composição com atividade feromonal corresponde as seguintes misturas: **A** (1-heptanol, linalol, (Z)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno), **B** (1-heptanol, linalol, (Z)-3-nonen-1-ol e (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol), **C** (1-heptanol, linalol, (Z)-3-nonen-1-ol e α -farneseno), **D** (1-heptanol, linalol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno), **E** (1-heptanol, (Z)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno), **F** (linalol, (Z)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno) e todas formuladas no substrato polimérico quitosana na dose de 0,1ng com a proporção entre mistura e substrato de 1:1.

PROBLEMA QUE A INVENÇÃO SE PROPOE A RESOLVER

[002] A mosca das frutas *Anastrepha obliqua* é um dos tefritídeos que geram prejuízos econômicos na América do Sul. Esta espécie polífaga tem impacto direto na produção de frutos, causando restrições quarentenárias na exportação desses para muitos países. Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores do mundo e, entre os principais frutos hospedeiros de *A. obliqua*, encontram-se a manga, a goiaba e a carambola. Em geral, os principais danos causados a esses hospedeiros são provocados por fêmeas e por suas larvas. As fêmeas depositam seus ovos no interior do fruto e, ao emergirem, as larvas se alimentam da polpa do mesmo, resultando na diminuição da qualidade do fruto. Além disso, os orifícios oriundos da inserção do ovipositor da fêmea na superfície do fruto facilitam o acesso de microorganismos oportunistas no seu interior, os quais também contribuem para a sua degradação. No Brasil, estima-se que cerca de 120 milhões de dólares/ano sejam gastos na produção, comercialização, processamento de frutas e principalmente no controle contra espécies de moscas das frutas; deste montante, aproximadamente 30% destina-se aos gastos na produção de frutos. Para evitar maiores perdas, o Ministério da

Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), em cooperação com a Associação Brasileira dos produtores de frutas (ABRAFRUTAS), por meio do programa de combate nacional as moscas das frutas, têm como meta investir até 2018 cerca de 128 milhões de reais para combater esses insetos, os quais, de forma geral, causam a depreciação dos frutos produzidos em todo o território nacional (BRASIL, 2015).

[003] A presente invenção se propõe a minimizar o problema enfrentado pelos produtores destes frutos, no que se refere ao ataque da praga em questão, pelo uso de formulações contendo misturas de compostos liberados por machos de *A. obliqua*.

CAMPO DE ATUAÇÃO

[004] A presente invenção destina-se ao emprego em plantios comerciais de goiaba, em diferentes regiões geográficas brasileiras e em países nos quais a cultura desse fruto vem sendo disseminada, visando o controle da praga e, consequentemente, a diminuição dos prejuízos causados pela mesma.

ESTADO DA TÉCNICA

[005] Dentre os principais desafios ligados à fruticultura, a produção sustentável de frutas tem sido aquele mais relevante nos dias atuais, principalmente devido ao uso indiscriminado de pesticidas organosintéticos de amplo espectro para o controle de insetos praga. Esses produtos são extremamente nocivos para o meio ambiente e para os seres humanos, e seu uso tem sido cada vez mais combatido no cenário internacional. O Brasil, no entanto, continua utilizando amplamente esses produtos sendo o maior consumidor mundial, resultando consequentemente, na produção de frutos com quantidades elevadas de agrotóxicos.

[006] Uma alternativa para o manejo destes insetos, que vem recebendo atenção especial nos últimos anos, é o controle por comportamento através do uso de semioquímicos, sinais químicos que atuam na comunicação intra e interespecífica (feromônio e cairomônio, respectivamente). No Brasil, esta prática vem sendo difundida como tecnologia alternativa por dispensar o uso de agrotóxicos mais nocivos, sendo uma ferramenta segura para a produção de frutos sem agredir o ambiente e ocasionar riscos à saúde dos produtores e consumidores. Assim, estudos que visem a caracterização e o desenvolvimento de rotas de síntese de compostos

com potencial na atração desses insetos pragas têm sido substancialmente intensificados.

[007] Grupos de pesquisadores vêm trabalhando na identificação dos componentes voláteis como atrativos para diversas espécies de pragas, incluindo as moscas das frutas. Atualmente as informações disponíveis sobre esses componentes encontram-se em várias bases de dados, por exemplo, "The Pherobase" (disponível na web em <http://www.pherobase.net/>).

[008] O monitoramento de insetos com armadilhas contendo semioquímicos sintéticos geralmente é utilizado para três finalidades: a) detectar a presença de insetos; b) conhecer a sua flutuação populacional; e c) conferir se existe a necessidade de aplicar medidas de controle. No entanto, as armadilhas estão disponíveis comercialmente apenas para o uso nos programas de manejo integrado de pragas (MIP).

[009] No Brasil, o uso de armadilhas utilizando semioquímicos, tais como atraentes sexuais (feromônios) sintéticos foi inicialmente utilizada no monitoramento da lagarta-enroladeira da maçã, *Bonagota salubricola* (Iscalure bonagota® e Biobonagota®) e da mariposa oriental *Grapholita molesta* (Biografolita® e Iscalure grafolita®). Essas armadilhas promovem capturas seletivas, apresentam baixo custo e servem para detectar as espécies praga, mesmo em épocas de baixa infestação.

[010] As patentes dos atraentes para as espécies *Grapholita molesta* e *Bonagota salubricola* foram depositadas no INPI sob número PI 0405346-0A2, onde os dois produtos estão protegidos pela mesma patente. O pedido BR 1020120135558A2, inclui o tortricídeo (leafroller), lagarta de cereais (Spodoptera), Sesiidae (Synanthesdon), lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*: PBW), mariposa da uva europeia (*Lobelia botrana*: EGVM), mariposa do tomate (*Keiferia ly copersicella*: TPW), mariposa da maçã marrom clara (*Epiphyes postvittana*), *Grapholita dimorpha*, minador de folhas de maçã (*Phyllonorycter ringoniella*), minador de folhas do tomate (*Tuta absoluta*) e mariposa-bode europeia (*Cossus cossus*). Além desses, outra patente referente a uma praga importante para cultura relevante no Brasil está relacionada a composição de atração, captura e/ou extermínio do percevejo da soja *Piezodorus guildinii* (PI 9903509-0), que tem como princípio ativo o composto 2,6,10-

trimetiltridecanoato de metila, responsável pela atração de várias espécies de percevejos da família Pentatomidae, incluindo o percevejo marrom da soja o *Euschistus heros*.

[011] Os atraentes que vem sendo usados no Brasil, especialmente em Alagoas, também demonstram boa eficiência, como é o caso do Rincoforol®, feromônio de agregação da broca do olho do coqueiro. Vale destacar que o feromônio da broca da cana de açúcar, *Diatraea flavipennella* (Crambidae), descoberta recentemente no Brasil, cuja formulação possui depósito de patente sob nº PI 0903698-9, foi depositado pelo grupo de Ecologia Química, responsável pelo presente pedido. Esta formulação possui alta eficiência em condições de campo quando empregadas em armadilhas para captura de machos visando à redução populacional da espécie para índices abaixo do nível de dano econômico.

[012] Semioquímicos, tais como os citados acima, atuam em quantidades extremamente pequenas, permanecendo no campo por vários meses e não são tóxicos, propiciando benefício ao produtor (VILELA & MAFRA-NETO, 2001). Existem registros de produtos utilizados como atraentes alimentares e feromonais como marcação de hospedeiros, aliados ou não a inseticidas, para moscas das frutas de diferentes espécies, incluindo *Bactrocera dorsalis* (US2011290909), *Ceratitis capitata* e *Anastrepha ludens* (US19874820513, BR8605335, GB2178315, PI 9914748-3 A2), além de *Anastrepha obliqua* cujos constituintes químicos obtidos de voláteis de frutos de *Spondias mobim* também foram formulados e patenteados (PI 0610227-1A2 e US2008030572). O composto linalol está patenteado como atraente para *Ceratitis capitata*, *Dacus dorsalis*, *D. curcurbitae* e *Anastrepha ludens* (PI 8605335). Nesta patente os inventores também reivindicaram os compostos: acetato de geranila; 2,5- dimetilpirazina; 2,3-dimetilpirazina; ácido (*E*)-2-hexenoico; furfural; (*E,E*)- α -farneseno e metil eugenol (GB2178315-A; BR8605335-A; US4820513-A). Com exceção dos atraentes feromonal e cairomonal para a espécie *A. fraterculus*, depositado pelo Grupo de Ecologia Química-UFAL, sob os números BR1020150164041 e BR1020160038219, respectivamente, até o presente momento, não existem registros em bases patentárias referentes aos atraentes para *A. obliqua* baseados em compostos voláteis oriundos do feromônio sexual.

[013] Assim, a utilização de semioquímicos como atraentes no controle de pragas vem sendo encarada como alternativa promissora, uma vez que seu impacto ambiental é mínimo se comparado às outras formas de controle de pragas atualmente empregadas. Essa possibilidade tem contribuído muito para o conhecimento dos hábitos reprodutivos dos insetos que atacam as plantações de culturas relevantes na fruticultura brasileira.

[014] Dada à importância dos semiquímicos no biocontrole de insetos-praga, várias propostas de síntese e formulação destes compostos têm sido relatadas em trabalhos publicados e em documentos de patente como alguns dos exemplos citados anteriormente. Este fato os torna potenciais produtos que podem ser aplicados sob a forma de formulações específicas e agricolarmente aceitáveis.

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA

[015] Os inventores da presente composição identificaram formulações em biopolímero dos compostos sintéticos oriundos do feromônio sexual de machos coespecíficos de *A. obliqua*. As formulações com atividade feromonal compreende as misturas **A**, **B**, **C**, **D**, **E** e **F** formada pelos compostos: 1-heptanol, linalol, (Z)-3-nonen- 1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α-farneseno em diferentes combinações, na dose de 0,1ng. A proporção entre compostos e substrato foi de 1:1 em todas as formulações descritas.

[016] A composição da invenção pode estar nas formas líquida, sólida e semissólida. Na forma sólida, a composição pode estar na forma micronizada, na forma de grânulos de pó. Na forma líquida, a composição da invenção pode estar na forma de soluções, suspensões ou géis.

[017] A composição da invenção pode incluir um ou mais aditivos para melhorar a estabilidade da composição, enchimentos, espessantes, solventes e aglutinantes. Exemplos de tais aditivos incluem, mas não estão limitados a, -óleos vegetais, tais como, óleo de oliva, óleo de soja, óleo de milho, óleo de girassol, óleo de canola e suas combinações. Exemplos de enchimentos incluem uma ou mais argilas minerais (por exemplo, atapulgita). Exemplos de solventes incluem álcool etílico, álcool metílico, hidrocarbonetos clorados, solventes de petróleo e suas combinações. Exemplos de aglutinantes incluem goma shellac, resinas acrílicas, epóxidos,

alquídicas, poliuretanas, óleo de linhaça e suas combinações. Estimulantes de apetite também podem estar presentes nas composições da invenção, estimulantes esses que incluem, mas não estão limitados a, óleo de semente de algodão, ésteres de ácido graxo de fitol, ésteres de ácido graxo de geranil geraniol, extratos de plantas, álcoois de plantas e suas combinações.

[018] A composição da invenção pode conter um ou mais agentes poliméricos tais como celuloses, proteínas, caseína, polímeros baseados em fluorcarbono, resinas hidrogenadas, ligninas, melamina, poliuretanas, polímeros vinílicos, tais como acetato de polivinila (PVAC), policarbonatos, polivinilideno dinitrila, poliamidas, álcool polivinílico (PVA), poliamida-aldeído, aldeído polivinílico, poliésteres, cloreto de polivinila (PVC), polietilenos, poliestirenos, polivinilideno, silicones, e combinações dos mesmos. Exemplos de celuloses incluem, mas não estão limitados a, metil celulose, etil celulose, acetato de celulose, acetato-butirato de celulose, acetato-propionato de celulose, propionato de celulose e combinações dos mesmos.

[019] As composições da invenção também podem incluir, desde que em baixas concentrações, um ou mais inseticidas químicos tais como cíflutrin, permetrin, cipermetrin, bifintrin, fenvalerato, flucitrinato, azinfosmetil, metil paration, malation e outros. As composições da invenção também podem incluir inseticidas biológicos, tais como toxinas e piretrinas naturais, proteínas de *Bacillus thuringiensis* e de *Beauveria bassiana*.

[020] As composições da invenção compreendem os componentes ativos e inertes em uma quantidade eficaz, que seja suficiente para atrair fêmeas virgens da espécie *A. obliqua* em pomares de frutos hospedeiros dessa praga. A quantidade eficaz mencionada corresponde a uma proporção que varia na faixa de 1 até 10 (p/p) de substâncias ativas (componentes da formulação).

[021] As etapas a seguir são referentes a experimentos para caracterização da atividade biológica atrativa dos componentes voláteis emitidos por machos de *A. obliqua*, obtidos através da técnica de aeração.

Coleta e acondicionamento dos frutos infestados para obtenção dos insetos adultos

[022] Foram realizadas coletas de frutos infestados com larvas da mosca das frutas *A. obliqua* no município de Maceió (AL) em pomares domésticos da região ($9^{\circ}36'02.9''S$, $35^{\circ}46'13.2''W$ - Santa Amélia). Os frutos de carambola, infestados com larvas da mosca das frutas *A. obliqua*, foram coletados para obtenção de insetos adultos, em seguida estes foram acondicionados em gaiolas de isopor (45L) com abertura na parte superior, coberta com tecido tipo *voil* para facilitar a aeração dos frutos e dentro da gaiola foi adicionado vermiculita de grânulo médio como substrato para pupação das larvas. As gaiolas com frutos infestados foram mantidas no anexo do laboratório de Ecologia Química em condições semiambientais.

Manutenção dos insetos

[023] Os insetos adultos, machos e fêmeas, foram mantidos em gaiolas de criação (20 cm x 30 cm x 15 cm) contendo dieta artificial (açúcar cristal, extrato de soja, açúcar mascavo, levedo de cerveja e gémen de trigo) na proporção 3:3:1:1:1, água servida em recipiente de plástico contendo esponja levemente umedecida e frutos de goiaba que serviram como substrato de oviposição para as fêmeas. No laboratório, estes frutos foram imersos em solução de água sanitária (15 mL/L) durante 20 min. para a desinfecção, em seguida foram transferidos para baldes de 15L contendo água à temperatura de 65°C por 1 min para tornar inviável ovos de moscas das frutas que, porventura, tenham sido depositados previamente na superfície do fruto. A manutenção das colônias de laboratório foi realizada duas vezes por semana com troca da dieta e do substrato de oviposição e introdução de novos insetos adultos provenientes das coletas de campo. Além disso, as gaiolas foram substituídas por gaiolas limpas em intervalos de 15 dias.

Obtenção dos extratos do feromônio de machos de *A. obliqua*

[024] A obtenção do extrato do feromônio de machos de *A. obliqua* foi realizada a partir da técnica de aeração conhecida também como “*headspace*” dinâmico ou “*purg and trap*” que consiste em um fluxo de ar que purga as substâncias voláteis, emitidas pela amostra, para um polímero adsorvente, neste caso 150 mg de Tenax® com diâmetro poroso de 60-80 mesh. Para produzir o fluxo de ar, foi utilizada uma bomba

de ar conectada a um fluxômetro usado para controlar a entrada do ar (0,5 L/min). Antes de ser introduzido na câmara (dessecador de vidro modificado com 20,0 cm de diâmetro e 18,0 cm de altura) contendo 50 machos sexualmente maduros, o ar de purga passou por um filtro de carvão ativo para remoção de possíveis impurezas contidas no mesmo. Os voláteis liberados pelos machos ficaram retidos no material adsorvente suportado em um *trap* de vidro contendo o adsorvente com as duas extremidades fechadas com lã de vidro dessilanizada. A cada período de 24 h o mesmo foi substituído por um novo *trap* previamente condicionado. Esse procedimento foi realizado durante sete dias, perfazendo um total de sete amostras. Após a coleta dos voláteis, foi realizada a dessorção dos *traps*, que consistiu na extração das substâncias por meio da passagem de solvente bidestilado (2,0 mL de hexano grau HPLC). A cada dessorção realizada, o volume do extrato obtido foi transferido para duas ampolas de vidro com capacidade para 2,0 mL. Cada ampola utilizada apresentando aproximadamente 1,0 mL do extrato do feromônio foi selada e acondicionada em freezer a temperatura de -5 °C para posterior análise e/ou utilização em ensaios de laboratório.

Identificação dos compostos eletrofisiologicamente ativos para fêmeas de *A. obliqua*

[025] Com o intuito de identificar quais constituintes químicos presentes nos extratos de machos de *A. obliqua* são detectados pelas antenas de fêmeas virgens coespecíficas, análises eletrofisiológicas foram realizadas em um cromatógrafo gasoso (Trace GC Ultra; Thermo Scientific, Milão, Itália), equipado com uma coluna DB-5 (30m x 0,25mm i.d. x 0,25 μ m film, ValcoBond) e um detector de ionização em chamas (FID) acoplado a uma interface de detecção eletroantenográfica provida pela Syntech (Kirchzarten, Alemanha) (GC-EAD). Uma alíquota das amostras (1,0 μ L) foi injetada em cromatógrafo gasoso HP 5890 sob o modo splitless. As fêmeas virgens de *A. obliqua* com idade variando entre 10-20 dias (N=6) foram utilizadas para as análises. A cabeça de cada fêmea foi extraída do tórax usando microtesoura, e sua base bem como a ponta de uma das antenas foi montada entre dois eletrodos capilares de vidro, preenchidos com solução de Ringer (8.0 g/L de NaCl, 0,4 g/L de KCl, 0,4 g/L de CaCl₂) ligado a fios de prata. Durante o processo, o fluxo de gás de

arraste, contendo os constituintes químicos separados na coluna, foi dividido em duas partes iguais: uma seguiu para a antena do inseto (detector antenográfico) e a outra para o FID, ocorrendo o registro simultâneo das respostas de ambos os detectores ao material eluído da coluna. Um composto foi considerado EAG-ativo quando induziu despolarização na antena em, pelo menos, três dos seis indivíduos testados.

Identificação de compostos voláteis empregando a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

[026] A análise dos extratos de machos coespecíficos em chamamento foram realizadas utilizando alíquotas de 1 µL das amostras hexânicas do feromônio através de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS; Agilent 7890ATM gas chromatograph, Agilent 5975C Series MSDTM mass spectrometer, Palo Alto, USA), sob o modo *splitless*, equipado com uma coluna apolar HP-5 (Agilent J&W; 30 m × 0.25mm d.i. 0.25µm espessura do filme). A temperatura do forno do GC foi mantida inicialmente a 40 °C por 2 min, aumentando gradativamente com velocidade de aquecimento de 4 °C min⁻¹ até atingir a temperatura final de 230 °C, sendo mantida por 4 min. O fluxo de hélio foi preservado em pressão constante de 7.0 psi. A interface do EM e do quadrupolo foram ajustadas em 230 °C e 150 °C, respectivamente. Os espectros de massas foram registrados em 70eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0.5 scan^{-s} de *m/z* 30- 350.

[027] A identificação dos compostos foi feita a partir de comparação de seus espectros de massas e tempos de retenção com padrões autênticos disponíveis nas bibliotecas de referência NIST08, Adams (2007) e Wiley Registry™ (versão 9), integradas ao software Agilent MSD Productivity ChemStation Agilent Technologies, Palo Alto, EUA. As atribuições de estrutura de componentes individuais foram confirmadas a partir da comparação do espectro de massas e do tempo de retenção de padrões disponíveis comercialmente. As áreas dos picos nos cromatogramas foram integradas para obtenção do sinal iônico total e seus valores foram utilizados para determinar as proporções relativas de cada composto presente nos extratos de machos coespecíficos.

Obtenção das soluções e formulações dos compostos sintéticos

[028] Os padrões dos compostos sintéticos (1-heptanol, linalol, (Z)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno) foram adquiridos comercialmente da *Sigma-Aldrich* (Brasil) apresentando grau de pureza $\geq 98,5\%$. Posteriormente, para o preparo das soluções dos compostos foram utilizados os procedimentos descritos a seguir: 10 μL do composto sintético foram transferidos para um balão volumétrico de 10,0 mL completando-se o volume com hexano bidestilado grau (HPLC) e homogeneizando a solução, obtendo-se assim, uma solução com concentração 1,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Esta concentração foi diluída em 100 vezes para obtenção da solução de concentração de 0,01 $\mu\text{L}/\text{mL}$. As soluções dos compostos foram acondicionadas em *vials* de vidro, os quais foram mantidos em freezer para posterior emprego nos bioensaios comportamentais. Volumes de 10 μL de cada solução dos compostos individuais/mistura na concentração de 0,01 $\mu\text{L}/\text{mL}$ foram formulados em *eppendorfs* separados contendo 10 mg de um substrato biopolimérico (quitosana com 65% de desacetilação), através da adsorção por contato em uma sala com temperatura controlada (25 °C) durante um período de 24h, garantindo a evaporação do solvente utilizado no preparo das soluções. As formulações obtidas resultaram na dose 0,1 ng.

Ensaios de laboratório com as formulações

[029] Os testes de dupla escolha foram conduzidos durante a fotofase, em sala com fotoperíodo controlado (14L:10D), no horário entre as 14:00-16:00 h, em arenas de vidro (45 cm x 30 cm x 30 cm) cobertas com tecido *voil*, onde os dois *eppendorfs* contendo as formulações foram pendurados equidistantemente (30 cm) em extremidades opostas da arena. Um *eppendorf* com a formulação composta por 10 mg do substrato biopolimérico e 10,0 μL do extrato do feromônio serviu como tratamento-testemunha (controle positivo) e como controle negativo o *eppendorf* com substrato. Nestes testes foram utilizados grupos de seis fêmeas virgens de *A. obliqua*, marcadas com tinta atóxica, com idades variando de 10-20 dias, as quais foram introduzidas na arena e o seu comportamento bem como o tempo necessário para chegar à fonte de liberação do odor foram registrados durante 20 min. Dois tipos de respostas comportamentais foram registradas: 1) comportamento agonístico e 2) comportamento de atração para a fonte de odor. Para que fosse possível contabilizar o comportamento realizado pelo inseto como comportamento agonístico observaram-se os seguintes atributos: procura pela fonte

de odor, arraste do ovipositor e alimentação na arena; e para pontuar o comportamento de atração observou-se o movimento ativo do inseto caracterizado pelo sobrevôô direcionado à fonte de odor e o toque e permanência na fonte. Para fins de análises estatísticas, foi considerada a soma dos dois comportamentos registrados. Foram realizadas quatro repetições por tratamento nas quais seis fêmeas foram utilizadas uma única vez durante os experimentos, considerando cada fêmea marcada como uma repetição.

[030] A atratividade dos compostos com atividade feromonal identificados como eletrifisiologicamente ativos, foi avaliada nos testes de dupla escolha com fêmeas virgens. Para tanto, inicialmente foram testados os compostos individuais: 1-heptanol, linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno, na proporção encontrada nos extratos de machos 95:0,7:1,5:1,5:1,5 respectivamente, na dose de 0,1 ng, frente ao extrato do feromônio (controle positivo) e posteriormente as seguintes misturas: **A** (1-heptanol, linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno), **B** (1-heptanol, linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol e (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol), **C** (1-heptanol, linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol e α -farneseno), **D** (1-heptanol, linalol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno), **E** (1-heptanol, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno) e **F** (linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno). O controle negativo (*eppendorf* com substrato) também foi avaliado em bioensaios de dupla escolha frente ao tratamento testemunha.

Análises estatísticas dos dados obtidos a partir dos bioensaios em laboratório

[031] Os dados foram analisados primeiramente com a finalidade de verificar os pressupostos paramétricos de normalidade e homogeneidade das variâncias dos resíduos pelos testes de Lilliefors e Kolmogorov-Smirnov ($p<0.05$). Uma vez atendidos, o teste *t* de Student ($p<0.05$) foi aplicado para verificação de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos em uma mesma repetição. Todas as análises estatísticas foram executadas com o software *Assistat 7.7*.

RESULTADOS OBTIDOS

Identificação de compostos eletrofisiologicamente ativos para fêmeas de *A. obliqua*

[032] As análises por Cromatografia Gasosa acoplada à Eletroantenografia (CG-EAG), conduzidas com fêmeas virgens de *A. obliqua* e extratos hexanicos de machos coespecíficos, revelou cinco compostos eletrofisiologicamente ativos (**Figura 1**). Destes compostos, quatro são álcoois: **(1)** 1-heptanol, **(2)** linalol, **(3)** (Z)-3-nonen-1-ol e **(4)** (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol e um é o sesquiterpeno, α -farneseno **(5)**.

[033] A atividade eletrofisiológica para os compostos (Z)-3-nonen-1-ol, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol, α -farneseno e (S,S)-(–)-epianastrefina foi observada em fêmeas virgens de *A. fraterculus* (MILET-PINHEIRO et al., 2015). Semelhantemente, os alcoóis linalol e 3,6-nonadien-1-ol foram reportados como EAD-ativos para *Bactrocera invadens* (BIASAZIN et al. 2014).

[034] Cruz-López et al. (2015), em estudos realizados com *Anastrepha striata*, identificaram três compostos ativos pelo emprego da técnica de GC-EAD, a saber: hexanoato de etila, linalol e octanoato de etila. Linz et al. (2013) demonstraram que 2-heptanona, acetato de 3-metil-2-butenila e linalol estimularam respostas antennais em quatro espécies de moscas pertencentes ao gênero *Drosophila*: *D. melanogaster*, *D. yakuba*, *D. orena* e *D. erecta*. O linalol também foi ativo para *Anastrepha ludens*, sendo um componente de uma mistura sintética empregada no monitoramento desta praga (GONZÁLEZ et al. 2006, RASGADO et al. 2009).

[035] López-Guillén et al. (2011) relataram a presença dos compostos (Z)-3-nonenol, nonadienol, um sesquiterpeno de identidade desconhecida, β -farneseno, (E,E)- α -farneseno, (Z,E)- α -farneseno e três isômeros do farneseno na mistura feromonal de *A. obliqua*. O (Z)-3-nonenol também foi identificado na mistura feromonal de machos de *A. suspensa*, *A. ludens* e *A. fraterculus* (HEATH et al. 2000; MILET-PINHEIRO et al., 2015). Já o composto 1-heptanol foi reportado como componente majoritário, representando aproximadamente 50% da mistura feromonal de machos de *A. obliqua*, além de estar presente, em menor concentração, nos extratos de glândulas salivares dessa mesma espécie (GONÇALVES et al. 2013). Nos extratos de carambola e manga, hospedeiros de *A. obliqua*, esse composto também foi identificado em

diferentes concentrações (GONÇALVES *et al.* 2013). Diante do exposto, os componentes identificados como eletrofisiologicamente ativos, desempenham papel fundamental na comunicação química por serem reconhecidos por diversas espécies de moscas das frutas que são consideradas pragas de importância econômica no Brasil e em outros países.

Atratividade de fêmeas de *A. obliqua* para compostos individuais com ação feromonal

[036] Em ensaios comportamentais em arena de dupla escolha, observou-se o comportamento de atratividade de fêmeas virgens de *A. obliqua* para as formulações contendo o feromônio sexual de machos e os compostos eletrofisiologicamente ativos oriundos do feromônio (**Figura 2**). De acordo com os resultados, todos os tratamentos avaliados desencadearam resposta comportamental nas fêmeas, porém, os componentes α -farneseno, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol, linalol e (Z)-3-nonen-1-ol apresentaram número médio de comportamentos semelhante aquele exibido para o extrato de machos coespecíficos, enquanto o componente 1-heptanol apresentou diferença estatística significativa quando comparado com o tratamento controle pelo do teste *t* de *Student* com $p<0,05$.

[037] A partir de testes comportamentais conduzidos em laboratório, Lopez-Guillén *et al.* (2011), demonstraram que machos e fêmeas de *A. obliqua* foram atraídos para o composto (Z)-3-nonenol quando comparado com o tratamento controle (hexano). Além disso, quando esse composto foi adicionado ao componente β -farneseno a nova mistura formada também eliciu atratividade significativa em insetos dessa espécie. A avaliação da atratividade de fêmeas de *A. fraterculus* conduzida por Milet-Pinheiro *et al.* (2015) demonstrou, em condições de laboratório, que essas fêmeas foram mais atraídas para soluções dos compostos sintéticos (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno quando comparados com o tratamento controle (hexano). Tais resultados demonstram que esses compostos induzem respostas comportamentais nesses insetos, desta forma, a busca por um método de controle para um inseto praga baseia- se em compostos que eliciam respostas comportamentais semelhantes aquelas exibidas quando expostos a mistura feromonal, a partir disso pode-se propor misturas que sejam efetivas na atração da espécie em questão.

Atratividade de fêmeas de *A. obliqua* para misturas com ação feromonal

[038] As misturas de voláteis desempenham papel crucial na decodificação de odores por parte dos insetos, uma vez que esses apresentam neurônios receptores de odores (ORN's) os quais permitem o reconhecimento de combinações específicas de voláteis (BEYAERT et al., 2010). Desta forma, as misturas **B, C, D, E** e **F** foram preparadas com o intuito de verificar o efeito de redundância de compostos, ou seja, se os componentes que eliciaram atração em fêmeas virgens contribuem para a atração das mesmas dentro de uma mistura. Os resultados obtidos demonstram que fêmeas de *A. obliqua* exibiram comportamento de atratividade para todas as misturas avaliadas nos experimentos de dupla escolha, no entanto a mistura **A**, contendo todos os componentes identificados no exemplo 1 apresentou diferença estatística significativa quando comparada com extrato de machos de acordo com o test *t* de *Student* com $p<0,05$ de acordo com a **Figura 3**.

[039] Os resultados demonstraram que a ausência dos compostos (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e (*Z*)-3-nonen-1-ol nas misturas **C** e **D** respectivamente, diminuíram o número médio de comportamentos exibidos pelas fêmeas de *A. obliqua* quando comparados a mistura **A**, sugerindo que tais componentes sejam essenciais no comportamento do inseto. Em relação à ausência dos compostos α-farneseno, linalol e 1-heptanol nas misturas **B, E** e **F** respectivamente, observou-se um aumento da média comportamental maior em comparação com a mistura **A**, indicando que tais componentes apresentam impacto menor na média de comportamentos exibidos por fêmeas. A diferença estatística observada para a mistura **A** em relação as misturas quaternárias, pode estar relacionada com a percepção olfativa dos insetos, sugerindo nesse caso que a complexidade dessa mistura pode ter contribuído para tal diferença apresentada quando a mesma foi comparada ao extrato de machos de *A. obliqua*. Esses resultados corroboram com aqueles descritos por Robacker et al. (1992), Zhou et al. (2003) e Alagarmalai et al. (2009) os quais demonstraram, para outras espécies de moscas das frutas, que misturas contendo um maior número de compostos não foram mais atrativas do que aquelas com um número menor de substâncias.

VANTAGENS DA PATENTE

[040] Com o objetivo de conter o desenvolvimento desse inseto-praga, o controle químico ainda é difundido nos dias atuais, onde a prática da pulverização da cobertura total da área cultivada é realizada utilizando-se defensivos químicos, que nas últimas décadas gerou problemas como: resíduos em frutos, desequilíbrio trófico e seleção de organismos resistentes (ROMANO, 2009). Esse tipo de controle vem sendo substituído ao longo dos anos por métodos menos agressivos, para o meio ambiente e consumidores, visto que, a redução no nível de agrotóxicos nos alimentos torna-se uma tendência a ser seguida pelos mercados produtores e cada vez mais exigida pelos mercados consumidores de frutos *in natura* (CARVALHO et al., 2000). Como medidas alternativas de controle de moscas das frutas destacam-se: o uso de atrativos alimentares em armadilhas modelos Jackson ou MacPhail e a liberação de machos estéreis, além da utilização de insetos e microrganismos benéficos, esses por sua vez, atuam combatendo a praga somente em estágios iniciais.

[041] A utilização de formulações com mistura atraente a partir do feromônio sexual, para esta praga pode significar a captura em massa da mesma, de modo a reduzir a população para índices abaixo do nível de dano. O princípio é inteiramente ecológico, pois são substâncias produzidas e utilizadas pelo próprio inseto e dessa forma agem especificamente sem interferir em organismos não alvos. A identificação dos compostos atrativos leva a uma nova possibilidade de controle da praga em estudo, podendo servir, se comprovada sua eficácia, como mais um método para ser agregado ao Manejo Integrado de Pragas (MIP).

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[042] Figura 1 - Identificação de compostos EAD-ativos na mistura feromonal liberada por machos de *A. obliqua*. Nota: (1) – 1-heptanol; (2) – linalol; (3) (Z)-3-nonen- 1-ol; (4) – (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol; (5) - α-farneseno. FID: detector de ionização de chamas; EAG: Eletroantenografia.

[043] Figura 2 – Atratividade de fêmeas virgens de *A. obliqua* para soluções de compostos individuais frente ao feromônio de machos. Nota: (1) – 1-heptanol; (2) – linalol; (3) (Z)-3-nonen-1-ol; (4) – (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol; (5) - α-farneseno. FID: detector de ionização de chamas; EAG: Eletroantenografia. Nota: (*) diferença

estatística significativa ao nível de 5% de probabilidade. ns – indica ausência de diferença estatística significativa pelo teste t de Student ($p<0.05$).

[044] Figura 3 – Atratividade de fêmeas virgens de *A. obliqua* para misturas das soluções dos compostos sintéticos frente ao feromônio de machos. Nota: A (1-heptanol, linalol, (Z)-3-nonen-1-ol, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno), B (1-heptanol, linalol, (Z)-3-nonen-1-ol e (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol), C (1-heptanol, linalol, (Z)-3-nonen-1-ol e α -farneseno), D (1-heptanol, linalol, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno), E (1-heptanol, (Z)-3-nonen-1-ol, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno) e F (linalol, (Z)-3-nonen-1-ol, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno). (*) diferença estatística significativa ao nível de 5% de probabilidade. ns – indica ausência de diferença estatística significativa pelo teste t de Student ($p<0.05$).

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação atraente com atividade feromonal para fêmeas da mosca das frutas *A. obliqua* (Diptera: Tephritidae) caracterizadas por compreender componentes identificados no feromônio sexual de machos coespecíficos, tratando-se da mistura dos componentes: 1-heptanol, linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e α -farneseno) na proporção de 95:0,7:1,5:1,5:1,5, respectivamente.
2. Formulação atraente com atividade feromonal para fêmeas da mosca das frutas *A. obliqua* (Diptera: Tephritidae), de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela mistura dos componentes, resguardando as proporções existentes no feromônio e formuladas no substrato polimérico quitosana na dose de 0,1ng com a proporção entre mistura e substrato de 1:1.

DESENHOS

FIGURA 01

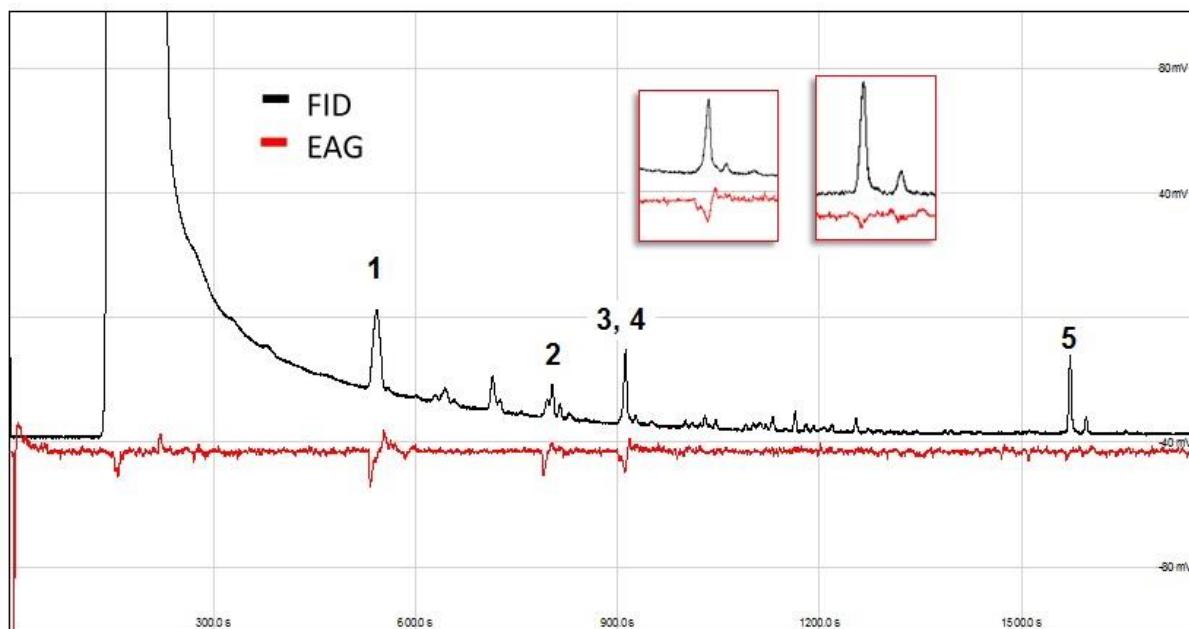


FIGURA 02

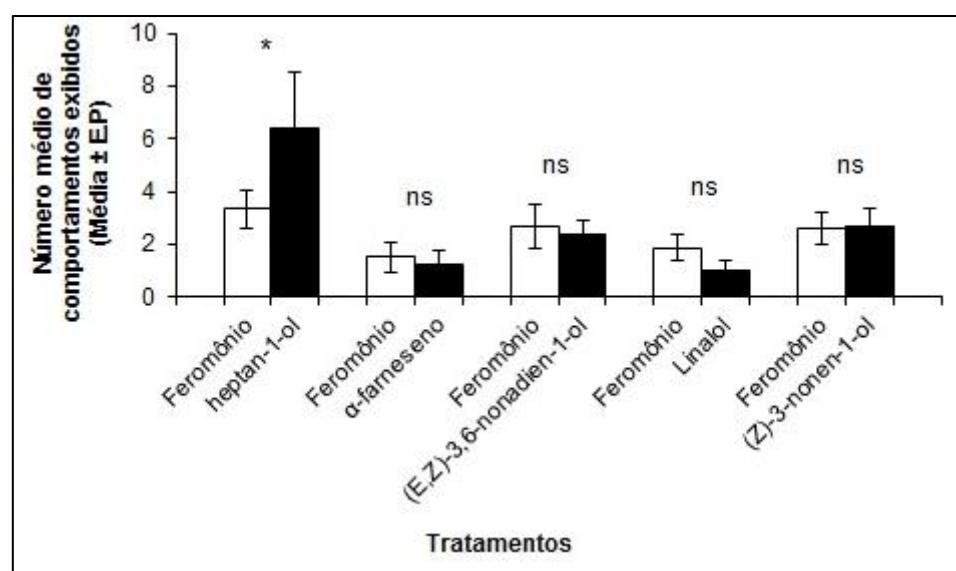


FIGURA 03