



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

CARTA PATENTE Nº BR 102018072563-7

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 102018072563-7

(22) Data do Depósito: 01/11/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 26/05/2020

(51) Classificação Internacional: A01N 65/08; A01P 19/00.

(52) Classificação CPC: A01N 65/08.

(54) Título: FORMULAÇÃO ATRAENTE PARA A. OBLIQUA (DIPTERA: TEPHRITIDAE) ORIUNDA DO FRUTO MANGUIFERA INDICA

(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: RUTH RUFINO DO NASCIMENTO; NATHALY COSTA DE AQUINO; RAPHAEL DE FARIAS TAVARES; LUANA LIMA FERREIRA; CLAUDINETE DOS SANTOS SILVA; JESSICA DE LIMA SANTOS; REGIVALDO DA SILVA MELO; RITA DE CÁSSIA CORREIA DA SILVA; FABIANE CAXICO DE ABREU GALDINO; ADRIANA DE LIMA MENDONÇA; PAULO MILET-PINHEIRO; DANIELA MARIA DO AMARAL FERRAZ NAVARRO.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 01/11/2018, 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 atraente para *A. obliqua* (Diptera: Tephritidae) oriunda do fruto *Manguifera indica*”

[1] O presente pedido de patente, refere-se às formulações com atividade cairomonal a partir de compostos voláteis liberados pelo fruto de manga (*Manguifera indica*) atraentes para fêmeas de mosca das frutas da espécie *Anastrepha obliqua*. A concretização destas formulações corresponde as misturas **M1**: α-pineno, canfeno, sabineno e β-mirceno, **M2**: α-pineno canfeno e sabineno, **M3**: α-pineno, canfeno e β-mirceno, **M4**: canfeno, sabineno e β-mirceno e **M5**: α-pineno, sabineno e β-mirceno, formuladas em 0,01g de um substrato biopolimérico resultando em uma dose de 10 ng nas proporções de 11,57:1:1:66,66 para os compostos α-pineno, canfeno, sabineno e β-mirceno, respectivamente.

PROBLEMA QUE A INVENÇÃO SE PROPOE A RESOLVER

[2] A fruticultura brasileira encontra-se em expansão, com um total de mais de dois milhões de hectares destinados à plantação de frutíferas de importância econômica, correspondendo a 2,6% da área total ocupada pela agricultura brasileira, cuja produção destina-se ao mercado nacional e internacional (ANUÁRIO FRUTICULTURA, 2017). Embora seja evidente o destaque da fruticultura no cenário nacional, , o Brasil sofre com as restrições fitossanitárias impostas pelos países importadores, nas relações comerciais internacionais de frutos *in natura*, decorrentes da conscientização dos consumidores externos quanto aos riscos da presença de agrotóxicos utilizados para o controle de infestações de insetos-praga nos frutos (GODOY *et al.*, 2011).

[3] Dentre os insetos-praga de restrição quarentenária encontram-se as moscas-das-frutas com destaque para a família Tephritidae que representa um grande obstáculo ao livre trânsito de frutas no comércio internacional devido as grandes perdas em frutíferas comerciais no Brasil (DUARTE & MALAVASI,

2000). Atualmente, os gêneros de moscas das frutas de maior importância econômica são *Ceratitis* e *Anastrepha*, responsáveis pela infestação da maioria dos frutos produzidas no Brasil (ZUCCHI, 2000).

[4] A distribuição geográfica de uma espécie está inteiramente relacionada com os hospedeiros que ela é capaz de utilizar como alimento, desta forma a diversidade de gêneros presentes no Brasil reflete suas interações com o hospedeiro e sua ocorrência e adaptações que resultaram das condições ambientais e da competição entre espécies (SELIVON, 2000). No gênero *Anastrepha*, as espécies mais polífagas são *A. fraterculus*, desenvolvendo-se em 115 espécies de hospedeiros com preferência por frutos da família Myrtaceae, e *A. obliqua* que se desenvolve em 49 espécies de frutos, principalmente os da família Anacardiaceae (ZUCCHI, 2012).

[5] A mangueira (*Mangifera indica L.*), é um dos principais hospedeiros de *A. obliqua* além de ser a principal espécie frutífera da família Anacardiaceae cultivada no Brasil (FERREIRA *et al.*, 2003). Atualmente, a manga é a fruta que o Brasil mais exporta alcançando os valores de 179 mil toneladas em 2017 gerando uma receita de mais de US\$ 205 milhões, essa frutífera é cultivada em quase todos os estados brasileiros, sendo explorada de forma extensiva em alguns estados a saber: Bahia, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Minas Gerais e São Paulo (Souza *et al.*, 2002). A escolha da variedade de manga a ser plantada é determinada de acordo com alguns fatores como a preferência do mercado consumidor, o potencial produtivo, a resistência ao manuseio e ao transporte para mercados distantes, as características físicas e químicas dos frutos e principalmente as limitações fitossanitárias (Pinto *et al.*, 2002).

[6] Considerando a importância da produção do fruto de manga para a economia do Brasil e a alta polifagia e capacidade de adaptação da espécie *A. obliqua*, propõe-se um potencial produto composto por formulações de misturas oriundas de um dos frutos hospedeiros preferenciais da praga que sejam eficazes na atração de fêmeas de *A. obliqua*.

CAMPO DE ATUAÇÃO

[7] A presente invenção propõe, o emprego das formulações atraentes para a captura de fêmeas em armadilhas em pomares comerciais de manga, presentes nas diferentes regiões brasileiras, através da liberação contínua de compostos atrativos.

ESTADO DA TÉCNICA

[8] A fruticultura brasileira tem se destacado, na produção, em área plantada, na exportação e na quantidade de tecnologias empregadas no campo, consequentemente a partir deste crescimento há um aumento no uso de agrotóxicos que colocou o Brasil entre os seis maiores consumidores de agrotóxicos do mundo entre os anos de 1970 e 2007 (JARDIM *et al.*, 2009; TERRA; PELAEZ, 2009). Posteriormente, o Brasil assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos, atingindo a marca de uso de mais um bilhão de litros de agrotóxicos (ANVISA, 2012).

[9] O uso de agrotóxicos no Brasil tem como objetivo o controle de alguns tipos de pragas, entretanto, a utilização indiscriminada destes produtos gerou, nas últimas décadas, uma série de problemas, tais como: a permanência de resíduos de pesticidas nos frutos, o desequilíbrio trófico e a seleção de organismos resistentes (SALLES, 2001). Dentre as pragas de importância econômica para a fruticultura brasileira, destaca-se as moscas das frutas (Diptera: Tephritidae) que são consideradas uma das pragas-chave da fruticultura mundial, sendo responsáveis por perdas de até 100% da produção em áreas onde ocorrem altas infestações (CARVALHO, 2006). Entre as espécies de moscas das frutas que causam grandes prejuízos econômicos, a espécie *A. obliqua* recebe destaque por estar associada a segunda maior quantidade de hospedeiros do seu gênero no Brasil.

[10] O controle da espécie *A. obliqua* também pode ser realizado através do controle cultural que consiste no ensacamento dos frutos, evitando assim, a oviposição das fêmeas, entretanto, este método não é viável, uma vez que requer uma grande mão-de-obra, resultando em um alto custo (SALLES, 1995).

Para um controle mais eficiente das moscas das frutas é necessário o emprego de técnicas, baseadas nos princípios preconizados pelo Manejo Integrado de Pragas (MIP), o qual envolve: o uso de atraentes alimentares como isca, o controle biológico, o monitoramento em área e o controle por comportamento que se dá através da utilização de semioquímicos (ZARBIN *et al.*, 2009; LIMA-MENDONÇA *et al.*, 2014).

[11] No que se refere ao uso de semioquímicos, trata-se de uma recente estratégia de controle baseada na utilização de substâncias voláteis, presentes nos frutos hospedeiros cujo uso tem sido demonstrado como promissor no controle de pragas. Isto ocorre, provavelmente, devido ao fato destes compostos desempenharem um importante papel no comportamento das moscas (LANDOLT *et al.*, 1992; 1997). Um dos obstáculos no uso de semioquímicos, é a volatilidade destes compostos, de maneira tal que precisam de materiais adorventes para garantir uma liberação a uma taxa relativamente constante durante o período de captura do inseto-alvo (EVALDO *et al.*, 1987).

[12] Os liberadores utilizados para semioquímicos são diversos, com destaque para o septo de borracha que possui sistemas matriciais, onde os semioquímicos estão adsorvidos em uma espécie de rede formada por cadeias de uma ou várias substâncias químicas polimerizadas, denominada matriz, que atua como agente modulador da liberação (MUÑOZ-PALLARES *et al.*, 2001). Um outro tipo liberador são os polímeros naturais, que tem como característica uma degradação não-tóxica, proveniente da desacetilação da quitina, um polissacarídeo presente no exoesqueleto de animais como crustáceos, moluscos e insetos (ANGELOVA e HUNKELER, 1999; SONIA & SHARMA, 2011).

[13] Dentre os biopolímeros naturais, os polissacarídeos mais usados são: ácido hialurônico, quitosana, goma xantana, e pectina, com destaque para a quitosana que pode ser utilizada para microencapsulação atuando como uma barreira contra os diversos fatores ambientais, que podem vir a liberar o material sob condições específicas e, ainda, em taxas controladas de

velocidade e quantidade (JANSSON-CHARRIER *et al.*, 1996; HEUSKIN *et al.*, 2011; SIONKOWSKA, 2011).

[14] No âmbito das moscas das frutas, formulações e liberadores já foram desenvolvidos com funções de marcação de hospedeiro, atraente alimentar, feromônio e cairomônios dentre eles, *Bactrocera dorsalis* (US2011290909), *Ceratitis capitata* e *Anastrepha ludens* (US19874820513, BR8605335, GB2178315, PI 9914748-3 A2). Para a espécie *Anastrepha fraterculus*, duas patentes foram depositadas sob os números BR1020150164041 e BR1020160038219 correspondendo respectivamente aos atraentes do feromônio e dos compostos comuns entre o feromônio e o fruto de goiaba, *Psidium guajava*.

[15] Em relação a espécie de *A. obliqua*, atualmente há o registro de duas patentes uma com ação feromonal (BR1020180000160) e a segunda com ação cairomonal cujos constituintes químicos referem-se aos voláteis de frutos de *Spondias mobim* testados em septos de borracha (MX YU05000008 e US2008030572). A atração de machos e fêmeas de *A. obliqua* para compostos voláteis de frutos de cajá e seriguela também já foi reportada, entretanto até o presente momento não há, nas bases patentárias, registro de formulações atraentes para fêmeas de *A. obliqua* oriundas do fruto de manga (ORTEGA-ZALETA & CABRERA-MIRELES, 1996; CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2006; TOLEDO *et al.*, 2009).

[16] Considerando o impacto causado pela espécie *A. obliqua*, para os cultivares do principal fruto exportado pelo Brasil, a manga, propõem-se a determinação de formulações atraentes para as fêmeas a partir dos compostos voláteis liberados por estes frutos, através do uso de técnicas analíticas e bioensaios comportamentais que comprovem a eficácia destas formulações.

DESCRÍÇÃO DA TÉCNICA

[17] Reivindica a composição das formulações em biopolímero dos compostos oriundos do fruto de manga atraentes para as fêmeas de *A. obliqua*. As formulações com atividade cairomonal compreende as misturas **M1**: a-

pineno, canfeno, sabineno e β -mirceno, **M2**: α -pineno canfeno e sabineno, **M3**: α -pineno, canfeno e β -mirceno, **M4**: canfeno, sabineno e β -mirceno e **M5**: α -pineno, sabineno e β -mirceno, formuladas em 0,01g de um substrato biopolimérico resultando em uma dose de 10 ng nas proporções de 11,57:1:1:66,66 para os compostos α -pineno, canfeno, sabineno e β -mirceno, respectivamente.

[18] A invenção poderá apresentar alterações em sua composição com intuito da obtenção de um produto mais eficiente. Dentre estas modificações está a forma de apresentação (líquida, sólida ou gasosa), adição de enchimentos, espessantes, solventes e aglutinantes para obtenção da estabilidade e estimulantes de apetite. Além disso, pode haver a adição de inseticidas químicos, inseticidas biológicos e agentes poliméricos.

[19] As formulações são compostas pelos componentes ativos e inertes eficientes na atração de fêmeas acasaladas de *A. obliqua* em pomares de manga a partir das seguintes etapas experimentais:

Coleta do material biológico e manutenção dos insetos

[20] Coletas de frutos de carambola infestados e sadios foram realizadas em pomares domésticos no município de Maceió-AL (9°39" 59' S, 35° 44" 6' W), no laboratório de Ecologia Química, da Universidade Federal de Alagoas, os frutos infestados, foram armazenados em gaiolas de isopor (44 x 35 x 25 cm) até a emergência das moscas. Posteriormente, os insetos adultos, foram mantidos em gaiolas de vidro (30cm x20,5cm x 16cm), onde foi disponibilizado para as moscas: dieta artificial rica em proteína e carboidratos (extrato de soja, açúcar, levedo de cerveja e germe de trigo na proporção 3:3:1:1) e três recipientes contendo água e frutos que servem para a domesticação da população. Duas vezes por semana foram efetuadas a limpeza destas gaiolas e a substituição dos recipientes contendo a dieta artificial, água e frutos, além da coleta das moscas que emergiram dos frutos infestados no campo e dos frutos retirados das gaiolas mantidas em laboratório. A temperatura da sala de criação foi

mantida em 25°C, umidade relativa de 60% e fotoperíodo de 14 horas (14h luz/10h escuro).

Coleta dos voláteis dos frutos de goiaba

[21] Para obtenção de extratos com os compostos voláteis do fruto de manga, foi utilizada a técnica de aeração. Para tanto, foram utilizados 250 gramas do fruto de manga no estágio verde e posteriormente foram colocados em um dessecador de vidro o qual foi acoplado a um fluxo de ar contínuo que purga as substâncias voláteis, emitidas pela manga, para um polímero adsorvente Tenax® (150,0 mg de diâmetro de 60-80 mesh). A bomba de ar (Resun® AC 2600), estava interligada a um fluxômetro (Supelco® 0,5 L/min) que controla a saída de ar para o dessecador. Antes do ar fluir através da câmara contendo os frutos, o ar de purga passou por um filtro de carvão ativo para retirar as impurezas. A cada período de 24 h, o trap contendo o adsorvente foi substituído por um novo trap previamente condicionado. Após este tempo, cada trap com os compostos voláteis adosridos na superfície do adsorvente foram dessorvidos com hexano bidestilado grau HPLC (2,0 mL), sendo este volume, distribuído em ampolas de vidro que foram seladas e acondicionadas em freezer para utilização nos ensaios de laboratório e eletroantenografia.

Cromatografia Gasosa acoplada à Eletroantenografia (GC-EAG)

[22] A técnica de eletroantenografia foi empregada para a identificação dos compostos do extrato de manga que geram a despolarização da antena de fêmeas acasaladas de *A. obliqua*, com 10-20 dias de idade. Para tanto, utilizou-se um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Eletroantenógrafo (GC-EAG) equipado com uma coluna DB-5 (30m x 0,25mm i.d. x 0,25µm film, ValcoBond) e um detector de ionização em chamas (FID) acoplado a uma interface de detecção eletroantenográfica provida pela Syntech (Kirchzarten, Alemanha) (GC-EAD). O total de dez fêmeas tiveram a cabeça extraída do tórax e uma das extremidades da antena foi interligada a um eletrodo contendo solução de Ringer (8.0 g/L de NaCl, 0,4 g/L de KCl, 0,4 g/L de CaCl₂). Os constituintes

químicos foram carreados por um gás de arraste dentro da coluna sendo dividido simultaneamente entre o FID e o detector biológico (antena do inseto). Um composto foi considerado EAG-ativo quando induziu despolarização na antena em, pelo menos, cinco dos dez indivíduos testados.

Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

[23] A identificação dos compostos eletrofisiologicamente ativos, foi realizada através da técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS, GC-MS; Agilent 7890A™ gas chromatograph, Agilent 5975C Series MSD™ mass spectrometer, Palo Alto, USA) utilizando 1 μ L das amostras hexânicas do fruto de manga sob o modo *splitless*, equipado com uma coluna apolar HP-5. A temperatura dos dois primeiros minutos foi de 40 °C aumentando gradativamente a uma velocidade de 4 °C min⁻¹ até atingir a temperatura final de 230 °C. A identificação foi realizada mediante o uso do software Agilent MSD Productivity ChemStation Agilent Technologies. Para a obtenção do índice de retenção uma série de n-alcanos (C8-C40; Sigma-Aldrich) foram coinjetados com amostras autênticas e os espectros de massas e índices de retenção dos compostos identificados foram comparados com os de padrões autênticos disponíveis nas bibliotecas de referência NIST08, Adams (2007) e Wiley Registry™ (versão 9).

Testes comportamentais

[24] Testes comportamentais com os compostos eletrofisiologicamente ativos, formulados individualmente e em misturas, foram realizados para determinar se existe a atração de fêmeas acasaladas para estas formulações. Inicialmente os compostos foram adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich, grau de pureza 98,5%) e posteriormente foram preparadas as formulações a base de quitosana as quais continham 0,01 g de um substrato biopolimérico e 10 μ l dos compostos individuais ou misturas resultando em uma dose de 10 ng nas proporções de 11,57:1:1:66,66 para os compostos α -pineno, canfeno, sabineno e β -mirceno, respectivamente. Os testes foram realizados em uma

arena de vidro (45 cm x 30 cm x 30 cm) cobertas com tecido *voil* no horário entre as 14:00-17:00 h, onde as formulações eram penduradas nas extremidades da arena, de maneira equidistante (30 cm). O

[25] Controle positivo foi o extrato do fruto de manga e o controle negativo o eppendorf contendo o polímero adsorvente (substrato de quitosana). O tempo de duração do bioensaio foi de 20 minutos onde foram realizadas 6 repetições por tratamento, utilizando-se 6 fêmeas acasaladas diferentes para cada repetição. Os comportamentos observados foram o agonístico e comportamento de atração para a fonte de odor. Para cada tratamento individual (α -pineno, canfeno, sabineno e β -mirceno) e suas respectivas misturas (**M1**: α -pineno, canfeno, sabineno e β -mirceno, **M2**: α -pineno, canfeno e sabineno, **M3**: α -pineno, canfeno e β -mirceno, **M4**: canfeno, sabineno e β -mirceno e **M5**: α -pineno, sabineno e β -mirceno). Para cada tratamento foram realizadas quatro repetições com o objetivo de avaliar a atratividade simultânea das fêmeas acasaladas para dois tratamentos diferentes.

Análise estatística

[26] As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software *Assistat 7.7*. Inicialmente foram aplicados os testes de Lilliefors e Kolmogorov-Smirnov ($p<0.05$) com o objetivo de avaliar os pressupostos paramétricos de normalidade e homogeneidade das variâncias dos resíduos. Os resultados atenderam os parâmetros de normalidade e homogeneidade, permitindo a aplicação do teste *t* de *Student* ($p<0.05$) para verificação de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos em uma mesma repetição.

RESULTADOS OBTIDOS

Identificação de compostos eletrofisiologicamente ativos

[27] Através da técnica de Cromatografia gasosa acoplada à eletroantenografia, foram identificados quatro compostos presentes no extrato do fruto de manga (Figura 1). Os compostos identificados foram: (1) butirato de etila, (2) α -pineno, (3) β -mirceno e (4) β -cariofileno (Figura 1).

Testes comportamentais com formulações individuais

[28] Os testes comportamentais com compostos individuais demonstraram que os quatro tratamentos individuais desencadearam resposta comportamental nas fêmeas com destaque para o composto sabineno que apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao extrato de fruto ($p<0,05$) (Figura 2).

Testes comportamentais com misturas

[29] Nos testes com as formulações das misturas, observou-se que as misturas M1, M2, M3, M4 e M5 foram atrativas, entretanto a M1 (α -pineno, canfeno, sabineno e β -mirceno) apresentou diferença significativa quando comparada ao extrato de fruto (Figura 3).

DISCUSSÃO

Identificação dos compostos eletrofisiologicamente ativos

[30] Os compostos que foram identificados como eletrofisiologicamente ativos no extrato de manga, para fêmeas acasaladas foram quatro terpenos, a saber: α -pineno, canfeno, sabineno e β -mirceno. A variedade de manga utilizada como controle foi a Tommy Atkins entretanto, há registro destes compostos presentes em outras variedades de manga. Em um estudo realizado por Malo *et al.* (2012), foram feitas análises químicas de três variedades de mangas, oriundas do Mexico, nas quais foram identificados os compostos α -pineno, canfeno e sabineno. Estudo semelhante foi realizado na Colômbia com um número maior de variedades de manga. Neste trabalho, o composto α -pineno foi encontrado em oito variedades de manga, o canfeno em seis variedades e o β -mirceno em oito variedades (QUIJANO *et al.*, 2007). No que se refere ao Brasil, foram analisadas 15 variedades de mangas das quais nove apresentavam o composto α -pineno em sua mistura cairomonal, uma

outra variedade o composto sabineno e em treze variedades o composto β -mirceno (ANDRADE *et al.*, 2000).

[31] A partir desta explanação, sobre a composição química do fruto de manga em três países, observa-se que os compostos EAD ativos são, na verdade, comuns a outras variedades de manga e possivelmente podem ser considerados compostos chaves, que caracterizam o fruto de manga e auxiliam insetos fitófagos como é o caso de *A. obliqua* no reconhecimento do hospedeiro. Um outro estudo realizado por Ferreira *et al.* (2003), no estado de Goiás, reportou o ataque de *A. obliqua* em 6 variedades de manga, confirmando a polifagia da praga dentro da família Anarcadiaceae. Além disso, um estudo realizado com a espécie *Bactrocera invadens* identificou os compostos eletrofisiologicamente ativos em frutos hospedeiros desta espécie, caracterizando o composto α -pineno como EAD ativo para o extrato de manga e o β -mirceno para os extratos de manga, goiaba e laranja (BIASAZIN *et al.*, 2014).

[32] Percebe-se que entre trabalhos com diferentes espécies de frutos e diferentes gêneros de moscas das frutas existe uma similaridade no reconhecimento de cairomônios indicando que as diferenças quantitativas e qualitativas de compostos chaves sejam o diferencial dentro da complexa mistura cairomonal de uma mesma família (BEYAERT *et al.*, 2010). Um outro aspecto curioso, em relação aos compostos EAD ativos deste trabalho, refere-se ao fato de alguns destes compostos estarem presentes na composição feromonal liberada por macho de *Anastrepha fraterculus* (α -pineno, canfeno e β -mirceno) e de *Ceratitis capitata* (α -pineno, sabineno e β -mirceno), concluindo-se que os mesmos compostos atuam em, pelo menos dois contextos distintos: como cairomônios e feromônio. (VANÍČKOVÁ *et al.*, 2012; MILET-PINHEIRO *et al.*, 2015).

Testes comportamentais com formulações individuais

[33] Nos bioensaios comportamentais observou-se que todos os compostos testados foram atrativos quando comparados com o extrato do fruto com

destaque para o sabineno que apresentou diferença estatística significativa. A atratividade para o compostos sabineno, só foi reportada com ação cairomonal apenas para o besouro *Monochamus alternatus*, não sendo descrita em nenhum outro trabalho como atraente cairomonal ou feromonal para nenhuma espécie de moscas das frutas ou de inseto pertencente a outra ordem (IKEDA *et al.*, 1980).

Testes comportamentais com formulações de misturas

[34] Alguns trabalhos reportam a importância das misturas voláteis dos hospedeiros na atração dos insetos, entretanto é preciso determinar as variáveis qualitativas e quantitativas para que estas misturas funcionem como pistas de reconhecimento (ZHU *et al.*, 2003; ALAGARMALAI *et al.*, 2009; WEBSTER *et al.*, 2010; BRUCE & PICKETT, 2011). Além disso, é necessário avaliar o efeito de redundância dos compostos presentes na mistura, visto que nem todos os componentes são essenciais no reconhecimento da mistura, considerando que a ausência de um composto na mistura, não diminuirá a resposta comportamental do inseto (BRUCE & PICKETT, 2011).

[35] A partir deste princípio, as misturas testadas neste trabalho tiveram como princípio a avaliação do efeito de redundância destes compostos, visto que a presente invenção objetiva eficiência e a viabilidade do produto formulado. Nos testes com as formulações das misturas, observou-se que todas foram atraentes, mas a M1 apresentou diferença estatística significativa quando comparada ao extrato de fruto. A ausência de um dos compostos EAD ativos na mistura M2, M3, M4 e M5 diminuiu o comportamento de atratividade dos insetos, a partir destes resultados observa-se que todos os componentes EAD ativos são essenciais para a atração das fêmeas de *A. obliqua*.

[36] Alguns trabalhos já reportaram que misturas cairomonais são mais eficientes na captura de moscas das frutas (CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2006; Malo *et al.*, 2012; BIASAZIN *et al.*, 2014). Estes estudos, em adição aos resultados apresentados neste trabalho, confirmam a eficácia de compostos voláteis liberados por frutos hospedeiros na atração de espécies de moscas das frutas.

Além de permitir compreender a relação de polifagia que existe nestes insetos uma vez que, mesmo utilizando hospedeiros de famílias ou espécies distintas observa-se um reconhecimento de compostos chaves. A partir destes resultados, demonstra-se que o presente trabalho pode ser um potencial produto para emprego em estratégias de controle de *A. obliqua*.

VANTAGENS DA PATENTE

[37] Atualmente os métodos de controle empregados para a espécie de *A. obliqua* consiste na utilização de inseticidas que segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) correspondem a Espinosade para citrus e manga e o Malatiom para a cultura do pêssego, entretanto sabe-se que o uso de inseticidas trazem efeitos que são prejudiciais à saúde, resistência aos insetos e problemas que envolvem as questões ambientais (WITZGALL, 2001).

[38] Uma alternativa que vem recebendo destaque no controle de pragas, consiste no uso de semioquímicos empregados no Manejo Integrado de Pragas (MIP) que é considerado um método mais específico e ambientalmente sustentável (LUX *et al.*, 2002; NARANJO *et al.*, 2015). No caso de *A. obliqua*, diversos estudos demonstraram que adultos desta espécie são atraídos por compostos voláteis de seus frutos hospedeiros (ORTEGA-ZALETA, CABRERA-MIRELES, 1996; CRUZ-LOPEZ *et al.*, 2006; TOLEDO *et al.*, 2009; MALO *et al.*, 2012; GONÇALVEZ, 2001). Em virtude da ineficiência e inviabilidade das técnicas atuais, faz-se necessário buscar novas estratégias de controle baseada na utilização de substâncias voláteis, presentes nos frutos hospedeiros; desta forma, a utilização das misturas de compostos oriundos do fruto de manga, formuladas em um biopolímero que sejam atraentes para fêmeas de *A. obliqua* torna-a um potencial produto para o controle desta praga quando incorporado as técnicas empregadas no Manejo Integrado de Pragas (MIP).

DESCRÍÇÃO DAS FIGURAS

[39] **Figura 1** - Compostos EAD-ativos na mistura volátil liberada por frutos de goiaba. Nota: (1) α-Pineno, (2) canfeno, (3) sabineno e (4) β-Mirceno. FID: detector de ionização de chamas; EAG: Eletroantenografia.

[40] **Figura 2** – Atratividade de fêmeas para formulações individuais. Nota: ns – indica ausência de diferença estatística significativa pelo teste t de Student ($p<0.05$). *- indica diferença estatística significativa

[41] **Figura 3**- Atratividade de fêmeas para formulações com misturas. Nota: **M1**: α-pineno, canfeno, sabineno e β-mirceno, **M2**: α-pineno e canfeno, sabineno, **M3**: α-pineno, canfeno e β-mirceno, **M4**: canfeno, sabineno e β-mirceno e **M5**: α-pineno, sabineno e β-mirceno ns – indica ausência de diferença estatística significativa pelo teste t de Student ($p<0.05$). *- indica diferença estatística significativa

REFERÊNCIAS

[42] ALAGARMALAI, Jeyasankar *et al.* Identification of host attractants for the Ethiopian fruit fly, *Dacus ciliatus* Loew. **Journal of chemical ecology**, v. 35, n. 5, p. 542-551, 2009.

[43] ANDRADE, Eloisa Helena A.; MAIA, José Guilherme S.; MARIA DAS GRAÇAS, B. Zoghbi. Aroma volatile constituents of Brazilian varieties of mango fruit. **Journal of food composition and analysis**, v. 13, n. 1, p. 27-33, 2000.

[44] ANGELOVA, N.; HUNKELER, D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. **Trends Biotechnology**, Amsterdam , v. 17, p. 409-421, 1999.

[45] 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.

[46] BIASAZIN, Tibebe Dejene *et al.* Identification of host blends that attract the African invasive fruit fly, *Bactrocera invadens*. **Journal of chemical ecology**, v. 40, n. 9, p. 966-976, 2014

[47] BRUCE, Toby JA; PICKETT, John A. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects–finding the right mix. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1605-1611, 2011.

[48] CARVALHO, C. *et al.* Anuário Brasileiro da fruticultura 2017. **Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz do Sul, RS**, 2017.

- [49] CRUZ-LÓPEZ, Leopoldo *et al.* A new potential attractant for *Anastrepha obliqua* from *Spondias mombin* fruits. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 2, p. 351-365, 2006.
- [50] DUARTE, A. L.; MALAVASI, A. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Embrapa** CPACT. 58p. 1995.
- [51] EVALDO F. VILELA, TEREZINHA MARIA C. DELLA LUCIA, **Feromônios de Insetos: Biologia, Química e emprego no manejo de pragas**, Viçosa, UFV, Imprensa Universitária, 1987
- [52] FERREIRA, Hérica de Jesus *et al.* **Infestação de moscas-das-frutas em variedades de manga (*Mangifera indica L.*) no Estado de Goiás**. 2003.
- [53] GODOY, M. J. S., PACHECO, W. D. S. P., & MALAVASI, A. (2011). Moscas-das-frutas quarentenárias para o Brasil. Silva, RA, Lemos, WP, Zucchi, RA **Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais**. Embrapa. Macapá, Amapá, Brasil, 111.
- [54] GONÇALVEZ, G.B. **Influência dos constituintes voláteis dos hospedeiros *Averrhoa carambola L.* e *Mangifera indica L.* na composição química das substâncias liberadas por machos de *Anastrepha obliqua* e *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, Brasil. 70p. 2001.
- [55] HEUSKIN, S. *et al.* The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.** v. 15, n. 3, p. 459-470, 2011.
- [56] Ikeda, T., Enda, N., Yamane, A., Oda, K., and Toyoda, T. 1980. Attractants for the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 15:358-361.
- [57] JANSSON-CHARRIER, GUIBAL, M.E.; ROUSSY, J.; DELANGHE, B.E.; LE CLOIREC, P. 1996. **Vanadium (IV) sorption by chitosan: kinetics and equilibrium**. *Water Research* 30, pp. 465–475.
- [58] JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes *et al.* Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global-Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, 2009.
- [59] LANDOLT, P.J. **Sex attractant and aggregation pheromones of male phytophagous insects**. *American Entomologist*. 43, 12-22. 1997.

- [60] LANDOLT, P.J., HEATH, R.R., CHAMBERS, D.L. **Oriented flight responses of female *Mediterranea* fruit flies to calling males, odor of calling males, and a synthetic pheromone blend.** Entomol. Exp. Appl., v. 65. P. 259-266. 1992.
- [61] LIMA-MENDONÇA, A., et al. **Semioquímicos de moscas das frutas do gênero *Anastrepha*.** Revisão Química Nova, Vol.XY, Nº00, 9p, 2014.
- [62] LUX, S.A.; VILARDI, J.C.; LIEDO, P.; GAGGL, K.; CALCAGNO, G.E.; MUNYIRI, F. N.; VERA, M.T.; MANSO, F. Effects of irradiation on the courtship behavior of medfly (Diptera: Tephritidae) mass reared for the sterile insect technique. Florida Entomologist, Lutz, v.85, n.1, p. 102-112, 2002.
- [63] MALO, Edi A. et al. Attraction of the West Indian fruit fly to mango fruit volatiles. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 142, n. 1, p. 45-52, 2012.
- [64] MILET-PINHEIRO, P., et al. Identification of male-borne attractants in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Chemoecology**. v. 25, n. 3, p. 115-122, Jun. 2015. ISSN: 0937-7409.
- [65] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/> > Acesso em: 5 de outubro de 2018.
- [66] MUÑOZ-PALLARES, J. et al. Zeolites as pheromone dispensers. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4801-4807, 2001.
- [67] NARANJO, S. E.; ELLSWORTH, P. C.; FRISVOLD, G. B. Economic value of biological control in integrated pest management of managed plant systems. **Annual Review of Entomology**, v. 60, p. 621-645, 2015.
- [68] ORTEGA-ZALETA, D.A., CABRERA-MIRELES, H. **Productos naturales y comerciales para la captura de *Anastrepha obliqua* M.** entrampas McPhail em Veracruz. **Agricultura Técnica em México**, v. 22, p. 63-75, 1996.
- [69] PELAEZ, V.; TERRA, FHB; SILVA, L. R. **A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente.** Artigo apresentado no XIV Encontro Nacional de Economia Política/Sociedade Brasileira de Economia Política—São Paulo/SP. de 09/06/2009 a 12/06/2009. 22p, 2009.
- [70] PINTO, A. C. Q.; SOUZA, V. A. B. de; ROSSETTO, C. J.; FERREIRA, F. R.; COSTA, J. G. da. Melhoramento genético. In: GENÚ, P. J. C.; PINTO, A. C. Q. (eds.). **A cultura da mangueira.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p.53-92.

- [71] QUIJANO, Clara E.; SALAMANCA, Guillermo; PINO, Jorge A. Aroma volatile constituents of Colombian varieties of mango (*Mangifera indica* L.). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, n. 5, p. 401-406, 2007.
- [72] SALLES, L. A. **Bioecologia e controle da mosca-das-frutas sul-americana**. Pelotas,
- [73] SALLES, L.A.A. **Conheça e controle o terror dos pomares: Mosca-das-frutas**. Caderno Técnico: *Revista Cultivar HF*, n°.05. 2001.
- [74] SELIVON, D. Relações com as plantas hospedeiras. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto, Holos, 327p, p. 87-91, 2000.
- [75] SIONKOWSKA, A.; **Progress in Polymer Science**. v.36, p.1254. 2011.
- [76] SONIA, T. A.; SHARMA, C. P. *Chitosan and Its Derivatives for Drug Delivery Perspective*. Advances in Polymer Science, v. 243, p. 23-53, 2011.
- [77] SOUZA, J. da S.; ALMEIDA, C. O. de; ARAÚJO, J. L. P.; CARDOSO, C. E. L. Aspectos Socioeconômicos. In: GENÚ, P. J. C.; PINTO, A. C. Q. (eds.). A cultura da mangueira. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p.21-29.
- [78] TOLEDO, Jorge *et al.* Field evaluation of potential fruit-derived lures for *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). **Journal of economic entomology**, v. 102, n. 6, p. 2072-2077, 2009.
- [79] VANÍČKOVÁ, LUCIE *et al.* Are the wild and laboratory insect populations different in semiochemical emission? The case of the medfly sex pheromone. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 29, p. 7168-7176, 2012.
- [80] WEBSTER, Ben *et al.* Between plant and diurnal variation in quantities and ratios of volatile compounds emitted by *Vicia faba* plants. **Phytochemistry**, v. 71, n. 1, p. 81-89, 2010.
- [81] WITZGALL, Peter. Pheromones-future techniques for insect control?. *IOBC wprs Bulletin*, v. 24, n. 2, p. 115-123, 2001.
- [82] ZALETA, DORA ALICIA ORTEGA; MÍRELES, HÉCTOR CABRERA. Productos naturales y comerciales para la captura de *Anastrepha obliqua* M. EN trampas mcphail en Veracruz. *Agricultura técnica en Mexico*, v. 22, p. 63, 1996.

- [83] ZARBIN, P.H.G., et al. **Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil.** Química Nova, Vol. 32, Nº. 3, 722-731, 2009.
- [84] ZHU, Junwei; PARK, Kye-Chung; BAKER, Thomas C. Identification of odors from overripe mango that attract vinegar flies, *Drosophila melanogaster*. **Journal of chemical ecology**, v. 29, n. 4, p. 899-909, 2003.
- [85] ZUCCHI, R. A. Taxonomia In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas das frutas de Importância Econômica no Brasil.** Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 13-24.
- [86] ZUCCHI, R.A. 2012. **Fruit flies in Brazil** - Hosts and parasitoids of the Mediterranean fruit fly. Available in: www.lea.esalq.usp.br/ceratitis/, updated on January 18. Acessado em 23 de janeiro de 2018.

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação atraente com atividade cairomonal para fêmeas da mosca das frutas *A. obliqua* (Diptera: Tephritidae) caracterizada por compreender componentes identificados no fruto hospedeiro de manga (*Mangifera indica*), tratando-se da mistura dos componentes: α-pineno, canfeno, sabineno e β-mirceno na proporção de 11,57:1:1:66,66, respectivamente.
2. Formulação atraente com atividade cairomonal para fêmeas das moscas das frutas *A. obliqua* (Diptera: Tephritidae), de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela mistura dos componentes, resguardando as proporções existentes no extrato do fruto hospedeiro de manga e formuladas no substrato polimérico de quitosana na dose de 0,1ng com a proporção entre mistura e substrato de 1:1.

DESENHOS

Figura 01

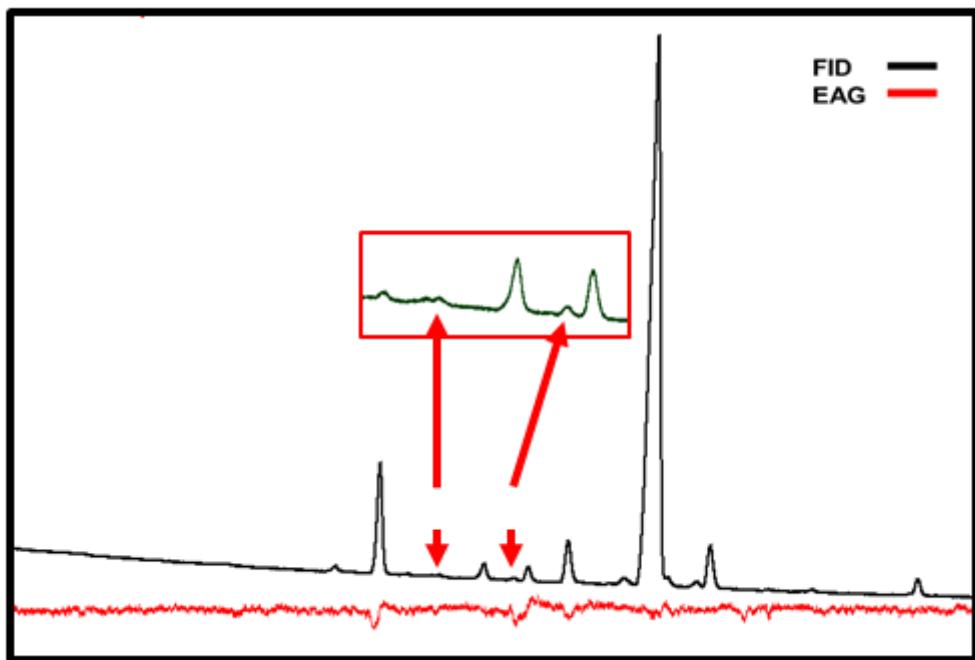


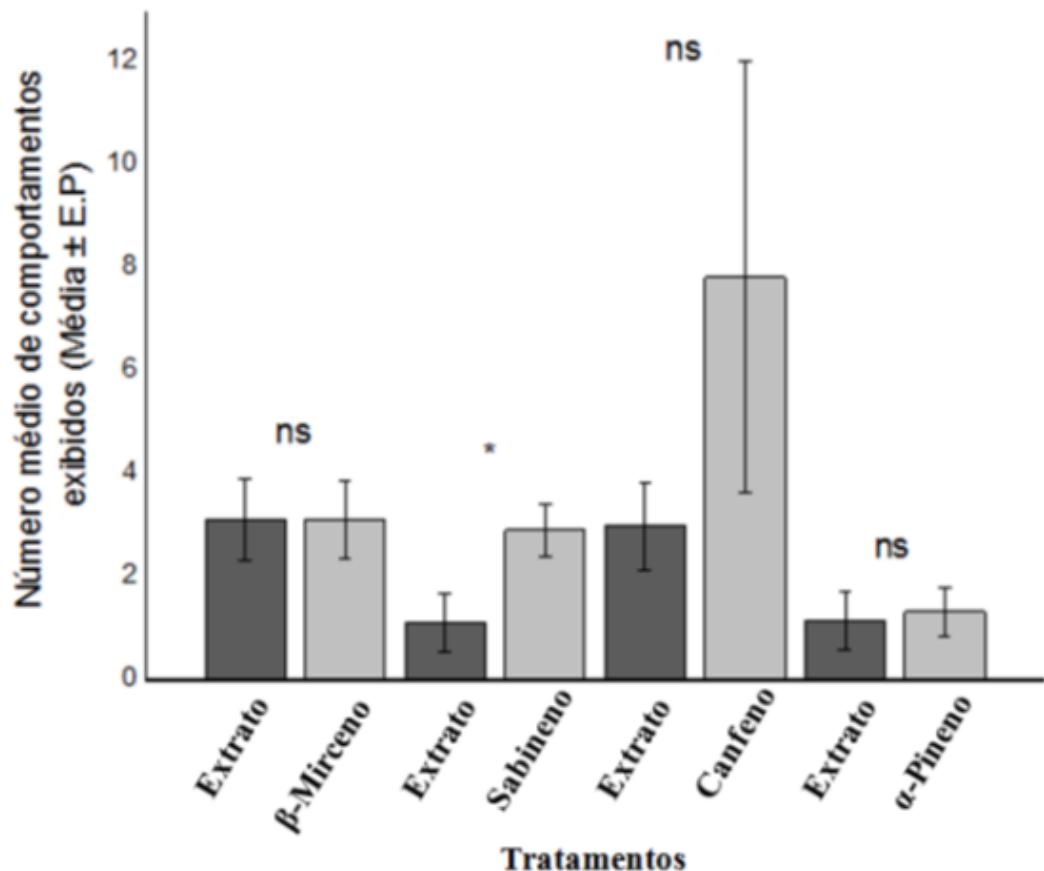
Figura 02

Figura 03