

ALEXSANDRO ARAUJO DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE ACETATOS MONOINSATURADOS
CANDIDATOS A FEROMÔNIO SEXUAL DE *Elasmopalpus lignosellus*
(ZELLER) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

ALEXSANDRO ARAUJO DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE ACETATOS MONOINSATURADOS
CANDIDATOS A FEROMÔNIO SEXUAL DE *Elasmopalpus lignosellus*
(ZELLER) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 6 de abril de 2001.

Dr. Paulo Afonso Viana
(Conselheiro)

Prof^a Terezinha Maria C. Della Lucia

Prof^a Célia Regina A. Maltha

Prof. Elson S. Alvarenga

Prof. Gulab Newandram Jham
(Orientador)

A Deus.
Aos meus pais Clóves e Arilza (*in memoriam*).
Aos meus irmãos.

AGRADECIMENTO

A Deus, pela vida e pelas oportunidades de evolução.

Aos meus pais, por todo amor e incentivo que dedicaram a mim e por me ajudarem a seguir meu caminho.

Aos meus irmãos Anderson e Cleidiane, por serem pessoas tão especiais na minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela realização do curso de mestrado.

Ao Prof. Dr. Gulab Newandram Jham, não só pela orientação deste trabalho, mas especialmente pelo profissionalismo, pela conduta e, sobretudo, pela grande amizade durante estes anos.

Ao Prof. Dr. Eraldo Rodrigues Lima, pela valiosa colaboração durante a realização do projeto, por todo o aprendizado relacionado à utilização do eletroantenograma e biologia dos insetos, pela paciência, pela co-orientação, pela disponibilidade e, principalmente, pela sua amizade.

Ao Dr. Paulo Afonso Viana, do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (Embrapa/CNPMS - Sete Lagoas, MG), pela co-orientação e dedicação dispensadas, pela valiosa colaboração quanto à emissão de insetos, pela paciência, e sobretudo, pela disponibilidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

Ao curso de Pós-Graduação em Agroquímica, pela oportunidade de desenvolvimento desta tese e por todo o conhecimento adquirido durante o curso.

A todo o pessoal do grupo de pesquisa (antigos e novos): Cleverson, Clodoaldo, Sérgio, Eduardo, Mirtes, Christian, Ricardo, Clécio, pela amizade e, principalmente, pela agradável convivência durante estes anos.

Aos meus amigos agrônomos Ana Paula, Cristina, Aline, Miriam e, especialmente, ao Roberson, pelas horas compartilhadas nos experimentos, no eletroantograma e, sobretudo, pelo incentivo e pela amizade.

Aos amigos e colegas dos laboratórios adjacentes e vizinhos: José Luís, Ricardo, Rui, Janaína, Gislene, Sílvia, Fernandinho, Adilson, Claudinei, pelo bom relacionamento e pela ajuda prestada.

Aos professores: Dra. Terezinha, Dra. Célia e Dr. Elson, por fazerem parte da banca de defesa.

Aos professores do Departamento de Química, pelo aprendizado e pela colaboração.

Aos amigos que conviveram comigo durante a graduação, em especial a Alessandra, Gessy, Pedro e Luzia.

Aos meus amigos de república Rodrigo, Fabrício, Antônio Carlos, Mauro, Fabiano, Jailson, Orlando, Zinho, Marco Antônio, Wagner, Dely, Diogo, Leonardo, entre outros, pela amizade e agradável convivência.

Aos amigos “viçosenses” Joselito, Araceli, Evandro, Enzo, Edvaldo, Bruno, Magela, Cristiano, Lurdes, Simone, Adriana, Waneska, Viviane, Sílvia, Clayton e Ewelyn, pela amizade e agradável convivência.

Aos demais colegas do Departamento de Química, pelo bom relacionamento e pela ajuda prestada.

A todos os meus amigos do Rio de Janeiro, em especial a Guilherme, Fernanda, Evelyn, Lamônica, Daniela e Mariane, que, mesmo distantes, estiveram sempre em meu coração.

A todos os funcionários do Departamento de Química e também da UFV, que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA

ALEXSANDRO ARAUJO DA SILVA, filho de Clóves Carvalho da Silva e Arilza Araujo, nasceu em Cabo Frio, Estado do Rio de Janeiro, em 7 de setembro de 1972.

Em dezembro de 1993, diplomou-se em Técnico em Química pela Escola Técnica Federal de Campos, em Campos, RJ.

No período de setembro de 1995 a março de 1999, realizou atividades de pesquisa, na qualidade de estagiário e posteriormente bolsista de iniciação científica, no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN)/DEQ/UFV, em Viçosa, MG.

Em março de 1999, graduou-se em Bacharelado e Licenciatura em Química pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em abril de 1999, iniciou o Curso de Mestrado em Agroquímica, na área de Química Orgânica de Produtos Naturais, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se a defesa de tese em 6 de abril de 2001.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Feromônios sexuais	4
2.2. Feromônios sexuais de lepidópteros	6
CAPÍTULO 1 - Identificação de acetatos candidatos a feromônio sexual em <i>Elasmopalpus lignosellus</i> (Zeller) (Lepidoptera: pyralidae)	9
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. Criação e manutenção de <i>Elasmopalpus lignosellus</i>	15
2.2. Extração do feromônio	16
2.3. Identificação de acetatos candidatos a feromônio sexual de <i>E. lignosellus</i>	17
2.3.1. Identificação de acetatos em extrato bruto de <i>E. lignosellus</i>	17
2.3.2. Análise dos padrões de acetatos monoinsaturados por “CG-EM”, para comparação com os compostos desconhecidos presentes nos extratos	18
2.3.3. Identificação de compostos ativos no extrato por “CG-DEA”	19
2.4. Preparo de derivados e condições de análise	19
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23

	Página
3.1. Análise dos extratos da glândula de feromônio de <i>Elasmopalpus lignosellus</i> em “CG-EM”	23
3.1.1. Extrato de glândula 1	23
3.1.2. Extrato de glândula 2	27
3.1.3. Extrato de glândula 3	29
3.2. Identificação da posição da dupla ligação por derivatização com “DMDS”, dos acetatos presentes nos extratos de glândulas	34
3.3. Atividade biológica dos extratos de glândula de feromônio de <i>E. lignosellus</i> em “CG-DEA”	37
3.3.1. Extrato de glândula 1	37
3.3.1.1. Análise 1	37
3.3.1.2. Análise 2	37
3.4. Análise das respostas dos padrões sintéticos na antena de <i>E. lignosellus</i> (macho) através de “Puffs”, no eletroantenograma	41
4. RESUMO E CONCLUSÃO	46
CAPÍTULO 2 - Determinação das propriedades de acetatos monoinsaturados similares a feromônios de insetos em cromatografia gasosa e espectrometria de massas	
	48
RESUMO	48
ABSTRACT	50
1. INTRODUÇÃO	52
2. MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1. Extração do feromônio	55
2.2. Instrumentação	55
2.3. Preparação dos padrões para análise	55
2.4. Determinação do tempo de retenção e padrão de fragmentação dos acetatos monoinsaturados analisados no “CG-EM”	56
2.5. Criação do banco de dados dos acetatos monoinsaturados de 12-18 átomos de carbono	56
2.6. Identificação dos compostos desconhecidos presentes nos extratos brutos de <i>Elasmopalpus lignosellus</i> e <i>Pseudaletia sequax</i> , injetado no “CG-EM”	57
2.7. Preparo de derivados e condições de análise	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.1 Tempo de retenção e padrão de fragmentação dos acetatos monoinsaturados analisados em “CG-EM”	60
3.2. Utilização do tempo de retenção e padrão de fragmentação para identificação de acetatos em extrato de glândulas de <i>P. sequax</i>	66
3.2.1. Análises em extratos de glândulas de <i>Pseudaletia sequax</i> .	67
3.2.2. Confirmação da posição da dupla ligação dos acetatos presentes nos extratos de <i>P. sequax</i>	73

	Página
3.3. Utilização do banco de dados para verificar a presença dos acetatos identificados nos extratos brutos de glândulas de <i>Pseudaletia sequax</i> e <i>Elasmopalus lignosellus</i>	79
4. RESUMO E CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
APÊNDICE	93

LISTA DE ABREVIATURAS

CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
DEA	Detector de eletroantenografia
CG-DEA	Cromatografia gasosa acoplada à detector de eletroantenografia
<i>SPLITER</i>	Separador de coluna capilar em forma de Y
<i>SPLITLESS</i>	Acessório do CG utilizado para análise de pequenas quantidades (nanograma (ng) ou picograma (pg)) de substâncias em uma amostra
t_r	Tempo de retenção absoluto
rt_r	Tempo de retenção relativo
ADD	Acetato de dodecenila
ATD	Acetato de tetradecenila
AHD	Acetato de hexadecenila
AOD	Acetato de octadecenila
$C_{12} - C_{18}$	Compostos contendo 12 a 18 átomos de carbono.
“PUFFS”	Sopro de ar úmido

“DMDS”	Dimetil dissulfeto
E/Z	Configuração geométrica de compostos insaturados
DB-1	Fase estacionária com 100% Dimethylpolysiloxane
Supelcowax-10 ...	Fase estacionária com Polyethylene Glicol
SP 2340	Fase estacionária com Polybiscyanopropylsiloxane
DB-5	Fase estacionária com 5%-phenyl/95%-dimethylpolysiloxane
m/z	razão entre a massa do fragmento e sua respectiva carga elétrica
M ⁺	Íon-radical molecular
mV	Milivolts
“SI”	<i>Similarity index</i>

RESUMO

SILVA, Aleksandro Araújo da, M. S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2001. **Identificação de acetatos monoinsaturados candidatos a feromônio Sexual de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae).** Orientador: Gulab Newandram Jham. Conselheiros: Paulo Afonso Viana e Evaldo Ferreira Vilela.

Foi obtido o tempo de retenção (t_r) e o espectro de massas em cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas de 76 acetatos lineares monoinsaturados (19 dodecenila, 23 tetradecenila, 22 hexadecenila e 12 octadecenila) em três colunas capilares de fases estacionárias diferentes [DB-1 (apolar), Supelcowax-10 (polar) e SP 2340 (altamente polar)]. Os dados obtidos foram utilizados na construção de um banco de dados no software do CG-EM, de modo a verificar a presença dos acetatos monoinsaturados em extratos bruto de glândulas de *E. lignosellus* e *P. sequax*. A cromatografia gasosa-espectrometria de massas (“CG-EM”) foi utilizada para a identificação dos acetatos, e cromatografia gasosa-eletoantenografia (“CG-DEA”) para identificar as substâncias ativas, onde foi possível identificar o acetato de (*Z*)-hexadec-11-enila pela “CG-EM” e acetatos de (*Z*)-tetradec-9-enila e (*Z*)-hexadec-11-enila pela “CG-DEA” que se mostraram ativos a antenas de *E. lignosellus*.

ABSTRACT

SILVA, Aleksandro Araújo da, M. S., Universidade Federal de Viçosa, April, 2001. **Identification of monounsaturated acetates candidates the sex pheromone from *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidóptera: Pyralidae)**. Adviser: Gulab Newandram Jham. Committee members: Paulo Afonso Viana e Evaldo Ferreira Vilela.

The retention times (tr) and the mass spectrum in gas chromatography coupled to mass spectrometry were obtained for 76 linear monounsaturated acetates (19 dodecenyl, 23 tetradecenyl, 22 hexadecenyl and 12 octadecenyl) with three capillary columns of different stationary phases [DB-1 (non-polar), Supelcowax-10 (polar) and SP 2340 (highly polar)]. The obtained data were used in the construction of a database in the software of the GC-MS, in way to verify the presence of monounsaturated acetates in rude extracts of glands of *E. lignosellus* and *P. sequax*. The gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used for the identification of the acetates, and gas chromatography-eletroantenography (GC-EAD) to identify the active substances, where was possible to identify the (Z)-hexadec-11-enyl acetate by GC-MS, the (Z)-tetradec-9-enyl and (Z)-hexadec-11-enyl acetates by CG-DEA, that were shown to be active to antennas of *E. lignosellus*.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional nos países em desenvolvimento e a falta de acompanhamento proporcional na produção agrícola têm agravado a fome mundial (PIMENTEL, 1985). Um dos principais fatores que contribuem para a queda no rendimento da produção agrícola é a existência de pragas (PIMENTEL, 1985). No Brasil, poucos são os estudos com a finalidade de estabelecer parâmetros de perdas por insetos na agricultura. As estimativas de perdas por insetos, no Brasil, são baseadas na perda média em cada cultura por ano. Dados relatados entre os anos de 1998 e 1999 mostram que a perda de produção agrícola no Brasil por causa do ataque de insetos foi de 7,1%, em média, variando de 2 a 30% (Ação Ambiental, 1999).

Os efeitos nocivos de inseticidas foram reconhecidos a partir de 1950, e os perigos do seu uso são a cada dia mais evidentes. Apesar disso, o uso de agrotóxicos na agricultura continua; nas últimas décadas, a dependência de inseticidas convencionais para o controle de insetos tem aumentado no mundo inteiro.

O uso de agrotóxicos na agricultura causa problemas sérios de toxicidade aos seres vivos, poluição ambiental e desenvolvimento de resistência pelas pragas. Assim, há necessidade de usar quantidade maior de pesticidas ao longo

do tempo, agravando o problema ambiental, inclusive diminuindo ou eliminando inimigos naturais das pragas.

Os feromônios, compostos voláteis usados pelos insetos na sua comunicação intra-específica, podem ser usados no monitoramento dos insetos, com a vantagem de não provocar os problemas que os agrotóxicos causam, pois são usados em quantidades extremamente pequenas. Um exemplo clássico de aplicação de feromônios é o seu uso no controle rotineiro de pragas de algodão *Pectinophora gossypiella* (DHAWAN e SIDHU, 1989), em grande escala nos EUA, por meio do feromônio sintético, tendo-se como grande vantagem o fato de o uso de quantidades extremamente pequenas não causar os problemas provocados pelo emprego de inseticidas convencionais.

Elasmopalpus lignosellus (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), também conhecida como lagarta-elasmo, é uma das principais pragas de várias culturas de importância agrônômica para a América Latina e o sul dos Estados Unidos (VIANA, 1981). Sua distribuição geográfica está relacionada à predominância de certas espécies vegetais, principalmente cereais, gramíneas e leguminosas de zonas quentes (BERTELS, 1970). No Brasil, esta praga está amplamente distribuída e provoca severos danos a diversas culturas (VIANA, 1981).

O método de controle de *E. lignosellus* mais comumente utilizado tem sido o químico. Controle com inseticidas envolvendo época e método de aplicação, dosagem e formulação tem sido estudado por ALL e GALLAHER (1977), All et al. (1979) e Brutoz et al. (1983), citados por VIANA (1993).

Devido ao seu grande potencial e à falta de um método de controle ecologicamente seguro, pesquisar o uso de feromônio de *E. lignosellus* é amplamente justificado, já que o controle químico é utilizado preventivamente e o controle na cultura instalada é dificultado em virtude das características de ataque do inseto, que ocorre no interior da planta.

Pseudaletia sequax (Franclemont, 1951) (Lepidoptera: Noctuidae), denominada vulgarmente lagarta-do-trigo, é uma severa praga desta cultura no Brasil, dada a sua capacidade de destruição de folhas e espigas (SALVADORI et al., 1983). Embora o grau de incidência varie a cada ano, com frequência atinge

populações que causam prejuízos à cultura. Até início dos anos 90, a única opção de controle da lagarta-do-trigo era o uso de inseticidas (SALVADORI e PARRA, 1990a).

Segundo Flanclemont (1951), citado por SALVADORI e PARRA. (1990b), *P. sequax* é uma espécie comum nos trópicos americanos, distribuídos desde o México até a Argentina. No Brasil, onde é praga de trigo, cevada e aveia, sua ocorrência já foi registrada nos estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (SALVADORI e PARRA, 1990b).

A literatura nacional e internacional é extremamente carente em publicações a respeito de *P. sequax*. Pouco se conhece sobre sua biologia, nutrição e exigências térmicas. As poucas informações disponíveis sobre a biologia de *P. sequax* são provenientes de trabalhos brasileiros (SALVADORI, 1987).

Assim, os objetivos deste estudo são identificar os acetatos presentes na glândula feromonal de *E. lignosellus* e *P. sequax*, utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (“CG-EM”); avaliar a atividade dos extratos de *E. lignosellus*, utilizando cromatografia gasosa acoplada ao detector de eletroantenografia (“CG-DEA”); e criar um banco de dados do espectro de massas dos padrões sintéticos dos acetatos de dodecenila (ADD), tetradecenila (ATD), hexadecenila (AHD) e octadecenila (AOD).

Este trabalho está apresentado em dois capítulos. O primeiro relata a identificação de acetatos monoinsaturados candidatos à feromônio de *E. lignosellus*, e o segundo, as propriedades dos acetatos monoinsaturados em “CG-EM” e suas utilidades.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Feromônios sexuais

Durante os últimos 30 anos, expandiu-se rapidamente o interesse na busca de feromônios de insetos, no esforço de proporcionar novos métodos de controle dos insetos-pragas (KOUTEK et al., 1998), abrindo assim novas possibilidades para o desenvolvimento de estratégias para o controle de insetos-pragas como alternativa ao uso de inseticidas convencionais (KOUTEK et al., 1992).

A grande maioria dos feromônios conhecidos hoje foi identificada em estudos com mariposas e borboletas. Os atraentes sexuais de longa distância têm recebido mais atenção em razão do seu potencial no uso em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (VILELA e DELLA LUCIA, 1987), pois os feromônios possuem potencial significativo para o controle de pragas, o que conduz a intensas investigações químicas e biológicas (LANNE et al., 1985).

A primeira estrutura química de uma substância ativa, desencadeadora do comportamento sexual, foi determinada como (10*E*, 12*Z*)-10,12-hexadeca-10,12-dien-1-ol (bombicol) em machos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), e um novo termo, “feromônio”, foi proposto para essa classe de substâncias biologicamente ativas (Karlson e Butenandt, 1959, citados por VILELA e DELLA LUCIA, 1987). A identificação de feromônios sexuais de lepidópteros teve então suas

portas abertas, e uma grande diversidade de novas moléculas foi descoberta (TUMLINSON et al., 1986).

No início, nos primeiros trabalhos com feromônios de lepidópteros acreditava-se que apenas uma substância estava envolvida na comunicação, em que exemplos apresentavam um quadro bastante simplificado (Roelofs e Cardé, 1977, citados por VILELA e DELLA LUCIA, 1987). Esse quadro hoje é bastante diferente: a grande maioria dos feromônios sexuais de lepidópteros constitui-se de mais de um componente. No entanto, existem alguns exemplos de sistemas nos quais uma única substância é capaz de desencadear a seqüência completa de atração e comportamento pré-copulatório nos machos, como em *Cydia nygricana* (WALL et al., 1976, citados por VILELA e DELLA LUCIA, 1987) e *Tuta absoluta* (ATTYGALLE et al., 1996a).

Na década de 70, o primeiro exemplo de um feromônio sexual multicomponente em lepidópteros foi identificado em fêmeas de *Spodoptera eridania* como uma mistura do acetato de (9Z, 12E)-tetradeca-9,12-dienila e acetato de (9Z)-tetradec-9-enila (Jacobsen et al., 1970, citados por VILELA e DELLA LUCIA, 1987). Os dois componentes estimulavam o comportamento sexual de machos individualmente e admitia-se que possuíam funções diferentes no comportamento de acasalamento desse noctuídeo. Esses autores especularam que o dieno agiria como um atraente de longa distância e o alqueno seria usado na comunicação quando os insetos se aproximassem. Embora essa diferenciação no que se refere à comunicação funcional dos componentes do feromônio não tenha sido provada, possíveis diferenças na função dos componentes do feromônio, em sistemas feromonais multicomponentes, foram e têm sido um dos tópicos essenciais no estudo de feromônios sexuais em lepidópteros.

O primeiro feromônio registrado para uso comercial nos EUA foi para o controle da lagarta-rosada do algodão *P. gossypiella* em 1978. Esse feromônio consiste da mistura de acetatos (7Z, 11Z) e (7Z, 11E)-hexadeca-7,11-dienila, sendo comumente chamado de gossyplure na proporção 1:1 (HUMMEL et al., 1973).

2.2. Feromônios sexuais de lepidópteros

A ordem Lepidoptera é composta de cinco subordens, 127 famílias, 29 subfamílias e mais de 130.000 espécies (PAKER, 1982).

Os feromônios sexuais mais estudados são daquelas espécies de lepidópteros economicamente importantes. As informações químicas e biológicas decorrentes desses estudos têm permitido a vários pesquisadores fazerem relacionamentos entre a estrutura química de feromônios e a taxonomia dos insetos (Roelofs e Brown, 1982, Inscoc, 1982, Tamaki, 1985, Doré et al., 1986, Renou et al., 1988, citados por TEIXEIRA, 1991; HORAK et al., 1988).

O comportamento de acasalamento em mariposas é mediado por feromônios sexuais emitidos por fêmeas, que atraem machos à distância, induzindo-os a um comportamento de corte. Embora esse comportamento de corte seja variável, a atração por odor de machos por parte das fêmeas está presente em quase todas as famílias de lepidópteros (Renou et al., 1988, citados por TEIXEIRA, 1991).

Os lepidópteros apresentam as seguintes particularidades em relação aos feromônios sexuais:

a) Geralmente são as fêmeas que produzem e liberam essas substâncias, em um determinado período de tempo, as quais estimulam e atraem os machos para o acasalamento.

b) Os seus componentes formam uma classe homogênea de substâncias químicas, constituídas principalmente por acetatos, álcoois, aldeídos, mono, di ou triinsaturados com cadeia carbônica alifática de 12 a 18 átomos (Tamaki, 1977, citado por TEIXEIRA, 1991).

c) Grande parte dos feromônios consiste de uma mistura de componentes (ATTYGALLE et al., 1995; KOUTEK et al., 1996), distribuídas em proporções diferentes.

Em vários artigos de revisão, têm sido relatadas várias substâncias identificadas como componentes de odores específicos de machos. Contudo, a atividade biológica dessas substâncias tem sido confirmada para poucas espécies

de lepidópteros (LYNCH et al., 1984; TEAL et al., 1985; BELL e MEINWALD, 1986; FRÉROT et al., 1989; HEATH et al., 1990; CHRISTENSEN et al., 1990).

Lofstedt et al. (1984), citados por TEIXEIRA (1991), identificaram em extratos de glândulas de feromônio sexual de *Agrotis segetum* 18 substâncias com possível relevância na comunicação química desta espécie. Testes em laboratório e no campo demonstraram, porém, que apenas três dessas substâncias - os acetatos de (Z)-dec-5-enila, (Z)-dodec-7-enila e (Z)-tetradec-9-enila - apresentavam atividade comportamental.

Os acetatos e álcoois monoinsaturados de 12, 14 e 16 átomos de carbono representam 84% do total de componentes de feromônios. No entanto, alguns insetos apresentam número ímpar de carbonos na cadeia principal de seus componentes (Persoons et al., 1976, citados por TEIXEIRA, 1991).

LYNCH et al. (1984) relataram a presença de 10 substâncias no extrato de glândulas de feromônio sexual de *E. lignosellus*, e apenas quatro destas substâncias - acetatos de (Z)-tetradec-7-enila, (Z)-tetradec-9-enila, (Z)-hexadec-11-enila e (Z)-tetradec-9-en-1-ol - mostraram atividade quanto à captura de machos, em testes realizados em campo nos EUA.

Sessenta e oito por cento das duplas ligações C=C em acetatos e álcoois monoinsaturados, identificados em insetos da ordem Lepidoptera, apresentam isomeria cis (Z), 29% trans (E) e 3% são duplas ligações terminais. Entretanto, algumas substâncias apresentam dienos e trienos conjugados ou alternados, e até mesmo, substâncias com tripla ligação, como o acetato de (Z)-hexadec-13-en-11-inila, de *Thaumetopoea pityocampa* (Thaumetopoeidae), relatado por GUERRERO et al. (1981). As duplas ligações, na maior parte, localizam-se nos carbonos 9 e 11 (57%).

Existem vários relatos na literatura para caracterização química de feromônios, sendo “CG-EM” a principal técnica utilizada (BYERS e HERLE, 1997; ATTYGALLE et al., 1995, 1996b; ATTYGALLE e MORGAN, 1988; ANDO et al., 1998; FERRÃO et al., 1998; LEAL et al., 1998; FERRARA et al., 2001).

A identificação de feromônios de insetos envolve a determinação da posição da dupla ligação C=C na molécula (LEONHARDT e DeVILBISS, 1985), bem como sua geometria (*cis* ou *trans*) de cada ligação dupla. Caso o composto seja poliinsaturado, ou seja, contenha mais de uma ligação dupla, a posição e a geometria devem ser determinadas. Essa tarefa é muito complexa, e na literatura existem poucos exemplos para identificação desses compostos (ATTYGALLE et al., 1995, 1996a,b).

Em vários artigos de revisão, têm sido relatadas várias técnicas que auxiliam na determinação da posição da dupla ligação carbono-carbono, em acetatos presentes em feromônios de insetos, como, por exemplo, tempo de retenção (absoluto e relativo), índice de retenção de Kovats (SPIEKSMAN et al., 1994; MARQUES et al., 2000) e fragmentação das massas (LANNE et al., 1985), utilizando padrões. Além disso, a posição da dupla ligação C=C pode ser determinada através da formação de derivados, como: ozonólise, epoxidação, etc. (BUSER et al., 1983; LANNE et al., 1985; HORIIKE et al., 1986). Esses métodos, recentemente, têm sido substituídos pela técnica de formação de derivados de dimetil dissulfeto (“DMDS”).

A técnica de adição estereoespecífica tem sido muito utilizada; trata-se da adição de DMDS a duplas ligações presentes nas estruturas (BUSER et al., 1983; LEONHARDT e DeVILBISS, 1985; VICENTI et al., 1987; ATTYGALLE e MORGAN, 1988; ATTYGALLE et al., 1995; PEPE et al., 1997). A posição da dupla ligação é determinada com o auxílio da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, após formação do derivado de DMDS (HEATH et al., 1980; BUSER et al., 1983; HORIIKE e HIRANO, 1987; DOOLITTLE et al., 1985; LEONHARDT e DeVILBISS, 1985; VICENTI et al., 1987; ATTYGALLE e MORGAN, 1988; PEPE et al., 1997).

CAPÍTULO 1

IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS CANDIDATOS A FEROMÔNIO SEXUAL EM *Elasmopalpus lignosellus* (ZELLER) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

RESUMO

SILVA, Alexsandro Araujo da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2001. **Identificação de compostos candidatos a feromônio sexual em *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae)**. Orientador: Gulab Newandram Jham. Conselheiros: Paulo Afonso Viana e Evaldo Ferreira Vilela.

Bioensaios para monitorar populações de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) realizados anteriormente no Brasil com armadilhas contendo feromônio sintético identificado nos EUA não foram satisfatórios. Nesta investigação foram identificados os acetatos presentes nas glândulas feromonais de *E. lignosellus*. Durante o período de chamamento, as glândulas feromonais de *E. lignosellus* foram retiradas e extraídas com hexano durante duas horas. A cromatografia gasosa-espectrometria de massas (“CG-EM”) foi utilizada para a identificação dos acetatos, e cromatografia gasosa-eletoantenografia (CG-DEA) para identificar as substâncias ativas. O acetato de (Z)-hexadec-11-enila foi identificado pela “CG-EM” e acetatos de (Z)-tetradec-9-enila e (Z)-hexadec-11-enila se mostraram ativos a antenas de *E. lignosellus* no CG-DEA.

ABSTRACT

SILVA, Alexsandro Araujo da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, April, 2001. **Identification and estimate of sex pheromone from *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae)**. Adviser: Gulab Newandram Jham. Committee members: Paulo Afonso Viana and Evaldo Ferreira Vilela.

Bioassays to monitor populations of *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) previously conducted in Brazil using synthetic pheromone identified in the USA were not satisfactory. This investigation was conducted to identify the acetates in *E. lignosellus*. During the period, the female pheromone glands of *E. lignosellus* were excised and extracted with hexane for 2 h. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was utilized for the identification of acetates and gas chromatography-eletoantenography (GC-EAD) for active compounds. (*Z*)-hexadec-11-enyl acetate was identified by GC-MS and (*Z*)-tetradec-9-enyl and (*Z*)-hexadec-11-enyl acetate were shown to be active to antennae of *E. lignosellus* in GC-EAD.

1. INTRODUÇÃO

A produção de feromônio sexual pelas fêmeas de *E. lignosellus* (Zeller) foi documentada pela primeira vez por PAYNE e SMITH (1975).

Elasmopalpus lignosellus é uma praga que ataca milho, soja, sorgo, entre outros, amplamente distribuída nas regiões temperadas e tropicais do hemisfério ocidental. A distribuição geográfica da espécie parece estar associada à predominância de certas culturas, principalmente cereais e leguminosas de zonas quentes (BERTELS, 1970). Assim, devido ao seu grande potencial já comprovado, pesquisar o uso de feromônio em lavouras de importância econômica é amplamente justificado. O uso de feromônios como agente de controle de pragas é especialmente promissor para espécies como *E. lignosellus*, que ficam abrigadas no interior da planta durante a alimentação.

Os danos da lagarta-elasma são mais intensos em solos arenosos e secos (Luginbill e Ainsle, citados por MAGRI, 1999). Nessas condições, foi verificado dano severo em cana-de-açúcar (BENNETT, 1962; SCHAAF, 1973). Resultados semelhantes foram descritos para plantas de feijão, amendoim, algodão, soja e milho (ISELY e MINER, 1944; KING et al., 1961; ABRAHÃO e AMANTE, 1970; Link e Santos, 1974, citados por MAGRI, 1999; SARMIENTO et al., 1973; VIANA, 1981).

Elasmopalpus lignosellus utiliza plantas jovens para se alimentar, provavelmente devido às características de seus tecidos meristemáticos. O ataque ocorre no interior do colmo, através da construção de galerias, provocando a morte da planta jovem. A partir de 30 cm de altura, em cana-de-açúcar, as lagartas não conseguem penetrar na planta, em razão do endurecimento do colmo (SCHAFF, 1973). Embora em outros estágios elas possam ser atacadas, as plantas em crescimento inicial são mais suscetíveis às injúrias (SELY e MINER, 1944).

O comportamento de chamamento em *E. lignosellus* foi descrito por PIRES et al. (1994); durante todo esse período as fêmeas movem intensamente as antenas, sem vibrar as asas. Geralmente inicia-se após a quinta hora de escuro, prolongando-se até o final da noite (PIRES et al., 1994); o maior número de fêmeas chamando ao mesmo tempo ocorre em torno da oitava hora de escuro (PIRES et al., 1994). Esses dados confirmam os resultados de Stone (1968), citado por HOLLOWAY e SMITH JR. (1975). As fêmeas, à medida que se tornam mais velhas, iniciam o chamamento mais cedo e passam mais tempo das horas de escuro com esse comportamento (PIRES et al., 1994). Fêmeas mais velhas, começando o chamamento antes, aumentam a probabilidade de acasalamento, pois serão as primeiras a atraírem machos (Sweir et al., 1977, citados por PIRES et al., 1994). Mudanças semelhantes, relacionadas com a idade, foram observadas em *A. ipsilon* por Swier et al. (1977, citados por PIRES et al., 1994) e em *Pseudaletia unipuncta* (HAW.) (Turgeon e McNeil, 1982, citados por PIRES et al., 1994).

O padrão de chamamento das fêmeas de *E. lignosellus* é caracterizado por ser descontínuo, ou seja, elas permanecem em posição de chamamento, expondo a glândula por algum tempo e, posteriormente, retornam o abdome à posição normal. Dentro de uma mesma faixa etária, existe uma variação muito grande no número e na duração dos períodos de chamamento (PIRES et al., 1994)

O feromônio sexual de *E. lignosellus* é produzido por uma glândula localizada na extremidade do abdome da fêmea, próximo ao ovopositor, de onde os componentes do feromônio sexual são exalados. Ao entrar em contato com a

corrente de ar, forma-se uma pluma de odor, que orienta o vôo do macho em direção à fêmea. Do gênero *Elasmopalpus*, já identificado nos Estados Unidos, somente uma espécie foi estudada, devido ao ataque a várias espécies de plantas no sul da Califórnia (LYNCH et al., 1984).

Os feromônios de Lepidoptera são normalmente acetatos e álcoois lineares, monoinsaturados de C₁₂-C₁₈. O *E. lignosellus*, por pertencer a esta ordem, talvez produza feromônios constituídos por compostos similares.

No extrato hexânico preparado das glândulas de *E. lignosellus*, encontrado nos EUA (LYNCH et al., 1984), 10 compostos foram identificados (Quadro 1: dois acetatos de tetradecenila, dois acetatos de hexadecenila, dois álcoois tetradecenílicos e dois álcoois hexadecenílicos, um acetato de tetradecanila e um acetato de hexadecanila), dentre os quais quatro foram identificados como componentes de feromônio, por meio de bioensaios (Quadro 2: dois acetatos de tetradecenila, um acetato de hexadecenila e um álcool tetradecenílico) . No entanto, o feromônio sexual da lagarta-elasma, em estudos feitos no Brasil, não apresentou resultados satisfatórios quanto à captura de machos, em testes realizados no campo (PIRES et al., 1994) com os compostos identificados por LYNCH et al. (1984).

Quadro 1 - Compostos detectados no extrato hexânico da glândula de feromônio de *E. lignosellus* (Lynch et al., 1984)

Número do composto	Compostos detectados no extrato hexânico da glândula do feromônio de <i>E. lignosellus</i>
1	Acetato de (Z)-TETRADEC-7-ENILA
2	Acetato de (Z)-TETRADEC-9-ENILA
3	Acetato de TETRADECANILA
4	(Z)-TETRADEC-7-EN-1-OL
5	(Z)-TETRADEC-9-EN-1-OL
6	Acetato de (Z)-HEXADEC-9-ENILA
7	Acetato de (Z)-HEXADEC-11-ENILA
8	Acetato de HEXADECANILA
9	(Z)-HEXADEC-9-EN-1-OL
10	(Z)-HEXADEC-11-EN-1-OL

Quadro 2 - Compostos identificados como feromônio após os ensaios biológicos (Lynch et al., 1984)

Compostos candidatos ao feromônio após ensaios biológicos
Acetato de (Z)-TETRADEC-7-ENILA
Acetato de (Z)-TETRADEC-9-ENILA
Acetato de (Z)-HEXADEC-11-ENILA
(Z)-TETRADEC-9-EN-1-OL

Para determinar a composição do feromônio de *E. lignosellus* encontrado no Brasil, inicialmente foram procurados compostos descritos na literatura e determinados seu tempo de retenção, seu padrão de fragmentação e sua atividade quanto à sua presença na antena do inseto, ou seja, acetatos e álcoois monoinsaturados do C₁₂-C₁₈, usando-se o cromatógrafo de fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas (“CG-EM”) e também cromatógrafo de fase gasosa acoplado ao detector eletroantegráfico (“CG-DEA”), utilizando colunas capilares de sílica fundida de 30 m x 0,25 mm de diferentes polaridades.

Foi também verificada a atividade de cada padrão de acetato monoinsaturado, de 12 a 16 átomos de carbono, na antena do inseto (macho), através do eletroantegráfico, por meio de “puffs”.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia foi feita em várias etapas:

- Criação de insetos.
- Extração do feromônio.
- Identificação de acetatos em extratos de *Elasmopalpus lignosellus*.
- Bioensaios.

2.1. Criação e manutenção de *Elasmopalpus lignosellus*

A técnica de criação e manutenção da praga foi feita utilizando dietas artificiais em laboratório, segundo CHALFANT (1975), e adaptada por VIANA (1981). A criação de *E. lignosellus* foi estabelecida no Insetário da Universidade Federal de Viçosa, a partir de ovos provenientes da criação do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS) - EMBRAPA/CNPMS, Sete Lagoas - MG, Brasil.

As lagartas recém-emergidas foram acondicionadas em copos plásticos transparentes de 100 mL de capacidade, contendo a dieta artificial descrita por CHALFANT (1975), juntamente com uma camada de vermiculita previamente autoclavada, permitindo aos insetos a construção de abrigos característicos,

quando não se encontravam em atividade. O fotoperíodo utilizado foi de 14L/10E, $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e 60 a 80% UR.

Os adultos recém-emergidos foram transferidos para gaiolas de PVC (10 cm de diâmetro x 20 cm de altura) contendo papel-toalha branco na superfície inferior, como substrato para oviposição, cobertas com tecido de malha fina na superfície superior. Para alimentação dos adultos, utilizou-se cerveja e, ou, solução sacarose 10%, oferecidas em alimentadores confeccionados com pipetas de Pasteur moldadas em fogo, os quais foram, posteriormente, fixados nas bordas laterais das gaiolas, através de um orifício.

Após a postura, o substrato de oviposição (papel-toalha branco) de cada gaiola era trocado, sendo os ovos colocados em sacos plásticos até a eclosão das lagartas, as quais eram posteriormente transferidas aos copos contendo a dieta artificial. Após a emergência dos adultos, estes eram retirados dos copos e transferidos para as gaiolas descritas anteriormente, para um novo ciclo reprodutivo.

2.2. Extração do feromônio

Glândulas produtoras de feromônio, localizadas na extremidade do abdome, próximo ao ovipositor de 20-30 fêmeas (adultos de 1-2 dias) de *E. lignosellus*, foram excisadas do abdome do inseto durante o período de chamamento (horários pré-definidos, em que a fêmea libera o feromônio para o macho) e extraídas com 100 μL de hexano ultrapuro por duas horas e concentrado a aproximadamente 30 μL , sendo injetado 1 μL no “CG-EM” e “CG-DEA”, conforme condições descritas nos Quadros 4 e 6, respectivamente.

Diversos extratos hexânicos foram feitos, com quantidades de glândulas diferentes, tanto de insetos criados no laboratório quanto daqueles capturados nas lavouras de cana-de-açúcar e milho.

2.3. Identificação de acetatos candidatos a feromônio sexual de *E. lignosellus*

Os extratos preparados foram analisados em um “CG-EM” QP5000, com um sistema quadrupolar de detecção e “GC-17A” com auto-injetor (AOC-17) da Shimadzu e um sistema de aquisição de dados Class 5000. Eles também foram analisados em um cromatógrafo GC-17A (com sistema de aquisição de dados Class GC10) acoplado ao eletroantenógrafo (Syntech Stimulus Controller CS-05).

As substâncias foram previamente identificadas, através da comparação do tempo de retenção e espectro de massas entre os acetatos desconhecidos presentes nos extratos e os dos padrões previamente analisados.

Os compostos, previamente identificados, foram confirmados pela formação de derivados de “DMDS” (ver item 2.4.) e posterior análise no “CG-EM”.

2.3.1. Identificação de acetatos em extrato bruto de *E. lignosellus*

A partir dos cromatogramas e espectros de massas obtidos dos extratos brutos, foi feita a comparação com o tempo de retenção e espectro de massas de todos os padrões (Quadro 3) posteriormente analisados.

A identificação foi feita por etapas:

Etapa 1: Identificação dos acetatos presentes no extrato bruto de feromônio de glândulas de *E. lignosellus*, injetado no “CG-EM”, sob as condições descritas no Quadro 4.

Etapa 2: Determinação do tempo de retenção e espectro de massas de 22 padrões do acetato de (Z e E) hexadecenila, injetados no “CG-EM”, nas condições descritas no Quadro 4.

Quadro 3 - Padrões sintéticos de acetato de hexadecenila comercializados

PADRÕES	ISÔMEROS
AHD	27 [13 de cada (E/Z), além do 15-AHD]

Etapa 3: Confirmação da posição da dupla ligação dos acetatos, por meio da formação de derivados pela reação de “DMDS”, nos extratos que apresentaram compostos similares aos padrões sintéticos de acetatos, mencionados neste trabalho.

2.3.2. Análise dos padrões de acetatos monoinsaturados por “CG-EM”, para comparação com os compostos desconhecidos presentes nos extratos

Os acetatos monoinsaturados, com 16 átomos de carbono (99%, 100 mg ou 100 μL), foram adquiridos da Holanda (IPP, Holanda). Foram adquiridos 22 isômeros do acetato de hexadecenila (AHD)

De cada padrão concentrado de acetato monoinsaturado foi retirada uma alíquota de 1 μL e dissolvida em 1 mL de hexano P.A., bidestilado, contido em um frasco de vidro de 1,5 mL, previamente rotulado.

Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 5 μL de cada solução preparada e adicionada em frascos de vidro, previamente rotulados, contendo 1 mL de hexano P.A., bidestilado, obtendo-se assim soluções-padrão com concentrações de 5 ng/ μL , sendo injetado 1 μL de cada padrão (cinco vezes) no “CG-EM”, conforme condições descritas n Quadro 4. Em cada frasco, foram adicionados dois padrões internos de hidrocarbonetos - tetradecano (C_{14}) e octacosano (C_{28}) - com concentração final de 5 ng/ μL , com a finalidade de se calcular o tempo de retenção relativo de cada composto em cada coluna.

2.3.3. Identificação de compostos ativos no extrato por “CG-DEA”

A identificação de componentes ativos de feromônio de inseto pode ser feita por meio da análise de extrato bruto em cromatógrafo gasoso acoplado ao eletroantenograma, onde são utilizadas antenas de insetos machos como receptores de substâncias ativas, e da identificação através de padrões sintéticos por meio de “puffs”, no eletroantenógrafo.

Nesse caso, a identificação foi feita pelas seguintes etapas:

Etapa 1: Foram analisados na antena do *E. lignosellus* (machos) todos os extratos obtidos a partir das glândulas do inseto-fêmea em estudo (BJOSTAD, 1998), a fim de determinar quais dos compostos detectados são fisiologicamente ativos, através da comparação com os padrões analisados sob as mesmas condições.

A análise da série de acetatos e dos extratos hexânicos da glândula do *E. lignosellus* no “CG-DEA” foi feita usando-se as seguintes colunas capilares de 30 m x 0,25 mm: SP 2340 (Supelco) e Supelcowax-10 (Supelco), e DB-5, de acordo com as condições descritas no Quadro 6.

Etapa 2: Foram testados na antena do *E. lignosellus* (machos) todos os isômeros dos acetatos da série ADD e ATD, bem como 22 isômeros do acetato da série AHD dos 27 isômeros existentes, num total de 64 compostos, através de “puffs” feitos no eletroantenograma. Esta série de testes revelou fortes candidatos ao feromônio sexual deste inseto, através de altas respostas em milivolts (mV) como resposta da antena do *E. lignosellus*, onde existem receptores específicos para determinados compostos.

2.4. Preparo de derivados e condições de análise

1) Os acetatos (padrões) e os extratos foram analisados por “CG-EM” em *splitless*, modelos Shimadzu QP5000 (com um sistema de detecção quadrupolar)

e GC 17A, equipado com um auto-injetor e um sistema de aquisição de dados Class 5000, de acordo com o método descrito no Quadro 4.

Todos os acetatos foram analisados em três colunas capilares de polaridades diferentes, de 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de filme, (DB-1, J e W Scientific, Supelcowax-10 e SP 2340, Supelco).

2) Para confirmar a posição da dupla ligação dos compostos similares a feromônio identificados nos extratos analisados, foi feita derivatização dos extratos com “DMDS” (BUSER et al., 1983), da seguinte forma: 25 µL de “DMDS” puro, foram adicionados em um frasco cônico contendo cerca de 20 µL de extrato e, em seguida, adicionaram-se 12,5 µL de solução de iodo em éter dietílico P.A., tratado com hidreto de lítio e alumínio (LiAlH₄) e destilado. A mistura foi aquecida por 50°C durante a noite (± 12 horas). Depois disso, foram adicionados (2x) 50 µL de hexano e gotas de solução de tiosulfato de sódio (5% m/v), até que ela ficasse completamente incolor (transparente). A mistura foi agitada, e a fase orgânica, transferida para um frasco limpo, sendo posteriormente concentrada sob um fluxo de nitrogênio até secar completamente. Em seguida, foram adicionados cerca de 20 µL de hexano, sendo o frasco agitado e analisado no “CG-EM”, nas condições descritas no Quadro 5.

3) Os extratos de glândulas de *E. lignosellus* foram analisados por “CG-DEA” em *splitless*, modelo Shimadzu GC 17A (com um sistema de aquisição de dados Class GC10) acoplado ao eletroanténografo, modelo Syntech Stimulus Controller CS-05, e um sistema de aquisição de dados (“EAG” e “EAD”), de acordo com o método descrito no Quadro 6.

4) Os padrões de acetatos também foram analisados no eletroanténografo por meio de “puffs”, utilizando o seguinte método:

Antenas de machos de um dia foram acondicionadas em eletrodos de prata com solução de KCl 0,1 N, com fluxo contínuo de ar a 5 mL/min. Os padrões foram aplicados nas antenas dos machos, por meio de uma pipeta de Pasteur, por 0,3 s, com fluxo de ar a 5 mL/min. Foram testadas 10 antenas para as séries de acetatos de dodecenila (ADD), tetradecenila (ATD) e hexadecenila (AHD).

Quadro 4 - Condições de cromatografia gasosa/espectrometria de massas (“CG-EM”) usadas para análise de padrões e extrato bruto de glândulas de *Elasmopalpus lignosellus*

Parâmetros	Condições
Colunas	DB-1: 30 m x 0,25 mm; 0,25 µm filme Supelcowax-10: 30 m x 0,25 mm; 0,25 µm filme 60 m x 0,25 mm; 0,25 µm filme SP 2340: 30 m x 0,25 mm; 0,25 µm filme
Temperatura inicial (coluna)	60°C
Temperatura final (coluna)	DB-1: 280°C (5 min) Supelcowax-10: 240°C (10 min) SP 2340: 230°C (1 min)
Variação da temperatura	6°C/min
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Fluxo de gás	1 mL/min
Temperatura do injetor	220°C
Temperatura da interface	250°C
Modo de ionização	Impacto de elétrons
Faixa de massa (m/z)	29 - 400
Voltagem de aceleração	70 eV

Quadro 5 - Condições de cromatografia gasosa/espectrometria de massas (“CG-EM”) usadas para análise de derivados de “DMDS” dos extratos de glândulas de *Elasmopalpus lignosellus*

Parâmetros	Condições
Coluna	DB-1: 30 m x 0,25 mm; 0,25 µm filme
Temperatura inicial (coluna)	100°C
Temperatura final (coluna)	DB-1: 320°C (1 min)
Variação da temperatura	6°C/min
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Fluxo de gás	1 mL/min
Temperatura do injetor	220°C
Temperatura da interface	280°C
Modo de ionização	Impacto de elétrons
Faixa de massa (m/z)	29 - 420
Voltagem de aceleração	70 eV

Quadro 6 - Condições de cromatografia gasosa/eletroantenografia usadas para análise de padrões e extrato bruto de glândulas de *Elasmopalpus lignosellus*

Parâmetros	Condições
Colunas	DB-5: 30 m x 0,32 mm; 0,25 µm filme SP 2340: 30 m x 0,25 mm; 0,25 µm filme
Temperatura inicial (coluna)	60°C
Temperatura final (colunas)	DB-5: 280°C (5 min) Supelcowax-10: 240°C (10 min) SP 2340: 230°C (1 min)
Variação da temperatura	8°C/min
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Fluxo de gás	1 mL/min
Temperatura do injetor	220°C
Temperatura do detector	250°C
Temperatura da interface (DEA)	220°C
<i>Range</i>	0 (zero)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Quadro 7 mostra a origem dos extratos de glândulas de feromônio de *E. lignosellus* que apresentaram em sua composição acetatos de hexadecenila.

3.1. Análise dos extratos da glândula de feromônio de *Elasmopalpus lignosellus* em “CG-EM”

Foram analisados 30 extratos de glândulas de feromônio de *E. lignosellus*, provenientes de insetos da criação em laboratório e insetos capturados em lavouras de cana-de-açúcar e milho.

3.1.1. Extrato de glândula 1

A Figura 1 mostra o cromatograma total de íons (CTI); a Figura 2, a ampliação do pico principal; e a Figura 3, o espectro de massas, obtidos na coluna DB-1 (30 m x 0,25 mm).

Quadro 7 - Origem dos extratos de glândulas de *E. lignosellus* que contêm acetatos de hexadecenila em sua composição e as técnicas utilizadas para identificação

Extratos de glândulas	Origem	Técnica utilizada para identificação
1	Glândulas provenientes de insetos criados em laboratório no ano de 1998 (1º semestre)	“CG-EM” (utilizando a coluna capilar DB-1) (item 3.1.1.)
2	Glândulas provenientes de insetos criados em laboratório no ano de 1998 (2º semestre)	“CG-EM” (utilizando a coluna capilar Supelcowax-10) (item 3.1.2.) “CG-DEA” (utilizando a coluna capilar SP 2340) (Análise 1 - item 3.3.1.1.)
3	Glândulas provenientes de insetos criados em laboratório no ano de 2000 (1º semestre)	“CG-EM” (utilizando três colunas capilares de diferentes polaridades) (item 3.1.3.) “CG-DEA” utilizando a coluna capilar DB-5) (Análise 2 - item 3.3.1.2.)

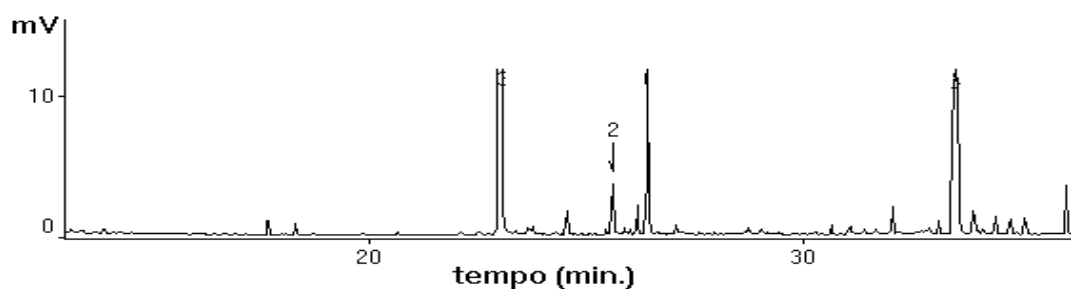


Figura 1 - Cromatograma total de íons (CTI) obtido com extrato hexânico da glândula do feromônio de *Elasmopalpus lignosellus* usando-se uma coluna capilar de sílica fundida, DB-1: 30 m x 0,25 mm.

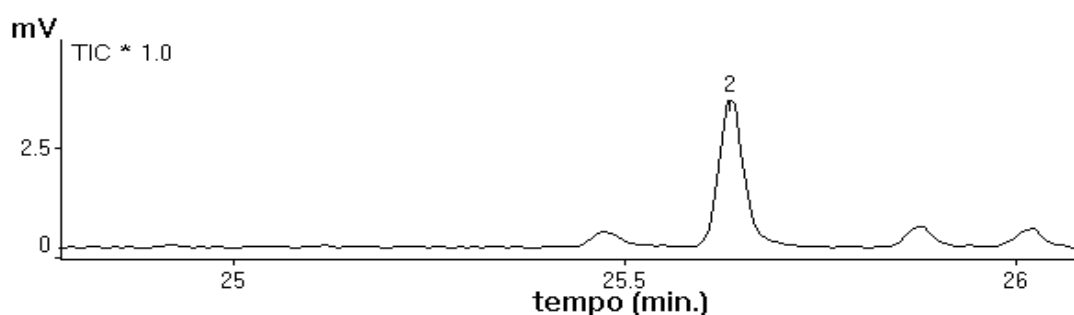


Figura 2 - Ampliação do pico 2 identificado.

O espectro de massas (Figura 3(a)) correspondente ao pico 2, apresenta o pico-base m/z 43 [CH_3CO^+], o que, em conjunto com outros fragmentos característicos e suas intensidades, indica ser um acetato. A perda do ácido acético a partir do íon molecular M^+ (não-detectado) leva ao aparecimento do íon [$\text{C}_{16}\text{H}_{30}$] $^+$ de m/z 222. A molécula de ácido acético, ao ser protonada, gera o íon m/z 61 [$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}_2$] $^+$, de baixa intensidade relativa (10%). Estes íons indicam que o pico 2 é um acetato de hexadecenila linear.

O pico 2 (Figuras 1 e 2) apresenta tempo de retenção (25,632 min) mais próximo de um acetato hexadecenila sintético (Quadros 1A e 2A), cromatografado sob as mesmas condições.

Comparando o tempo de retenção do pico 2 com o tempo de retenção dos padrões sintéticos de acetato de hexadecenila, cinco possíveis isômeros (Quadros

1A e 2A) são candidatos a serem a substância representada pelo pico 2 (Figura 1), sendo eles os acetatos: (*E*)-hexadec-10-enila (25,559 min), (*E*)-hexadec-11-enila (25,614 min), (*E*)-hexadec-12-enila (25,660 min), (*Z*)-hexadec-11-enila (25,629 min) e (*Z*)-hexadec-12-enila (25,732 min).

Comparações com o tempo de retenção de todos os isômeros dos acetatos (*Z*)/hexadecenila e (*E*)/hexadecenila foram feitas, como mostram os Quadros 1A e 2A.

Quando se compara o espectro de massas do pico 2 (Figura 3(a)) com o espectro de massas dos padrões dos acetatos de hexadecenila sintético (Figura 3(b)), nota-se uma acentuada analogia.

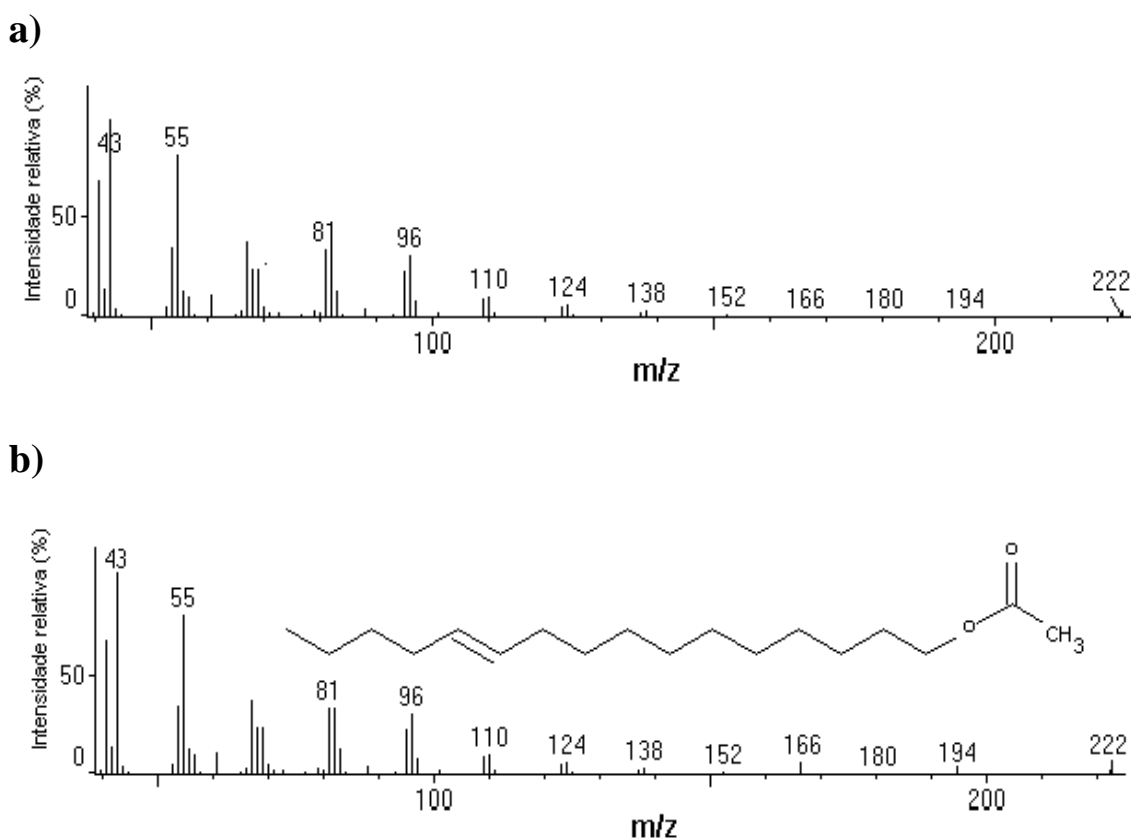


Figura 3 - a) Espectro de massas do pico eluído em 25,632 min. b) Espectro de massas do padrão sintético (*Z*)-11-AHD.

3.1.2. Extrato de glândula 2

A Figura 4 mostra o cromatograma total de íons (CTI); a Figura 5, a ampliação do principal pico; e a Figura 6, o espectro de massas, obtidos na coluna Supelcowax-10 (60 m x 0,25 mm).

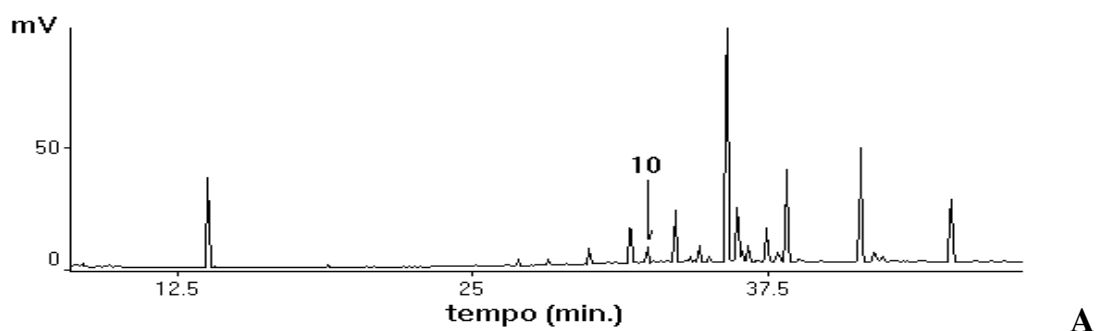


Figura 4 - CTI (cromatograma total de íons) obtido com extrato hexânico da glândula do feromônio de *Elasmopalpus lignosellus* usando-se uma coluna capilar de sílica fundida, Supelcowax-10: 60 m x 0,25 mm; 0,25 μ m.

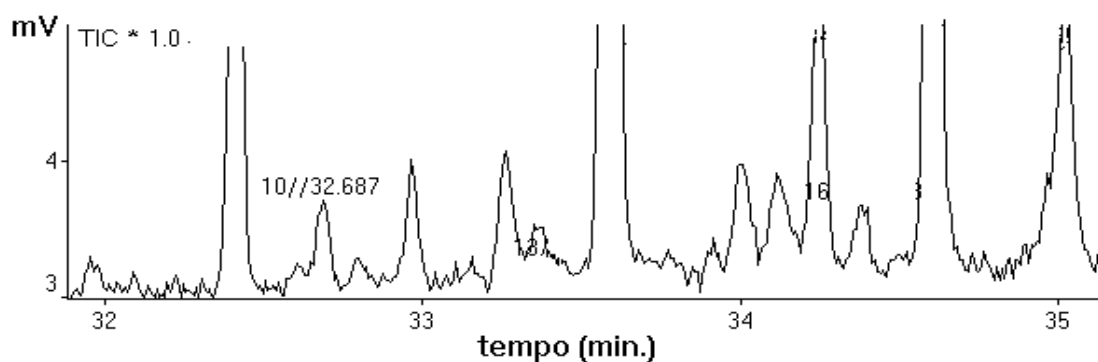


Figura 5 - Ampliação do pico 10 identificado.

O espectro de massas (Figura 6(a)) correspondente ao pico 10 apresenta o pico-base m/z 43 $[\text{CH}_3\text{CO}^+]$, o que, em conjunto com outros fragmentos característicos e suas intensidades, indica ser um acetato. A perda do ácido acético a partir do íon molecular M^+ (não-detectado) leva ao aparecimento do íon $[\text{C}_{16}\text{H}_{30}]^+$ de m/z 222. A molécula de ácido acético, ao ser protonada, gera o íon m/z 61 $[\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}_2]^+$, de baixa intensidade relativa (10%). Estes íons indicam que o pico 10 é um acetato de hexadecenila linear.

O pico 10 (Figura 4 e 5) apresenta tempo de retenção (32,687 min) mais próximo do acetato hexadecenila sintético, cromatografado sob as mesmas condições.

Comparando o tempo de retenção do pico 10 com o tempo de retenção dos padrões sintéticos de acetato de hexadecenila, cinco possíveis isômeros, são candidatos a serem a substância representada pelo pico 10 (Figura 4 e 5), sendo eles os acetatos: (*E*)-hexadec-10-enila (32,395 min), (*E*)-hexadec-11-enila (32,480 min), (*E*)-hexadec-12-enila (32,480min.), (*Z*)-hexadec-11-enila (32,628 min) e (*Z*)-hexadec-12-enila (32,785 min).

Foi obtida a comparação com o tempo de retenção dos isômeros dos acetatos de (*Z*)/hexadecenila e (*E*)/hexadecenila, que forneceram tempo de retenção mais próximo da análise feita na coluna DB-1 (item 3.1.1.).

Quando se compara o espectro de massas do pico 10 (Figura 6(a)) com o do acetato de hexadecenila sintético (Figura 6(b)), nota-se uma acentuada analogia.

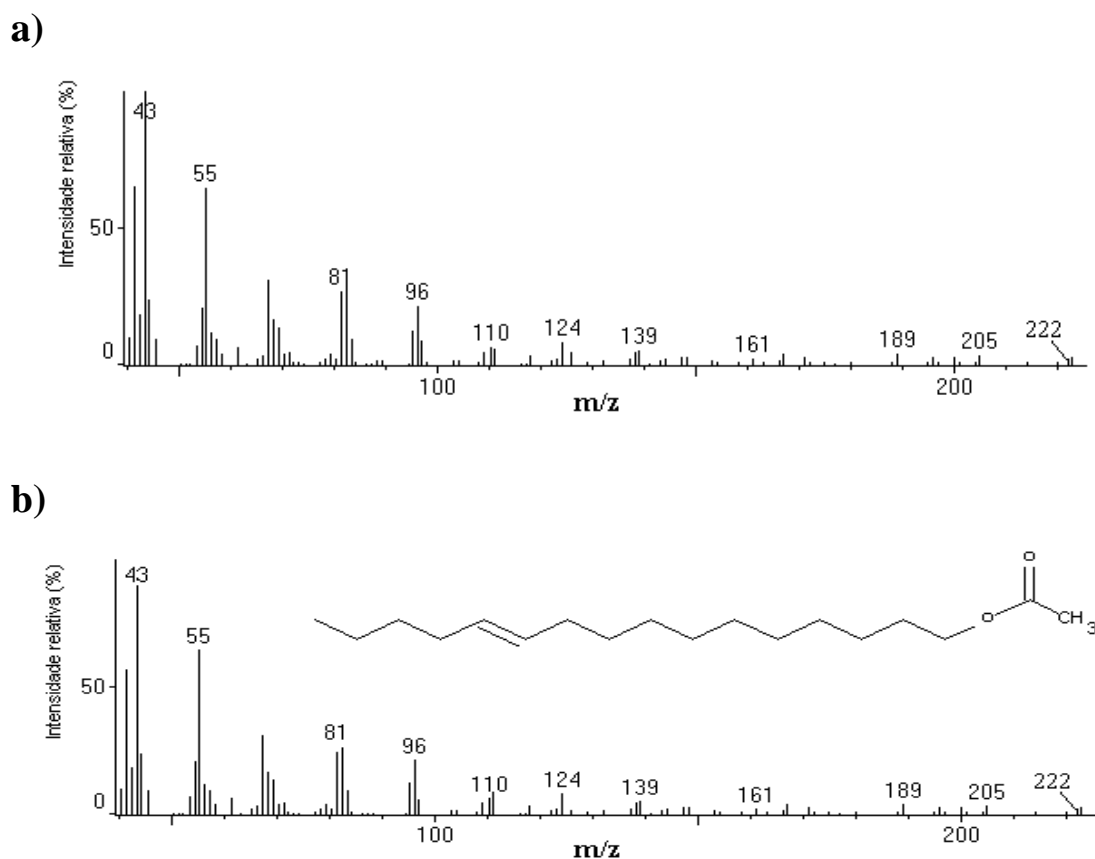


Figura 6 - a) Espectro de massas do pico 13 eluído em 32,687 min. b) Espectro de massas do padrão (Z)-11-AHD.

3.1.3. Extrato de glândula 3

A Figura 7(a) mostra o cromatograma total de íons (CTI); e a Figura 7(b), a ampliação dos principais picos, obtidos na coluna SP 2340 (30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m).

O espectro de massas (Figuras 8, 9 e 10) correspondente aos picos 5, 6 e 7 apresenta o pico-base m/z 43 [CH_3CO^+], o que, em conjunto com outros fragmentos característicos e suas intensidades, indica ser um acetato. A perda do ácido acético a partir do íon molecular M^+ (não-detectado), leva ao aparecimento do íon [$\text{C}_{16}\text{H}_{30}$] $^+$ de m/z 222. A molécula de ácido acético, ao ser protonada, gera o íon m/z 61 [$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}_2$] $^+$, de baixa intensidade relativa (10%). Estes íons indicam que os picos 5, 6 e 7 são acetatos de hexadecenila linear.

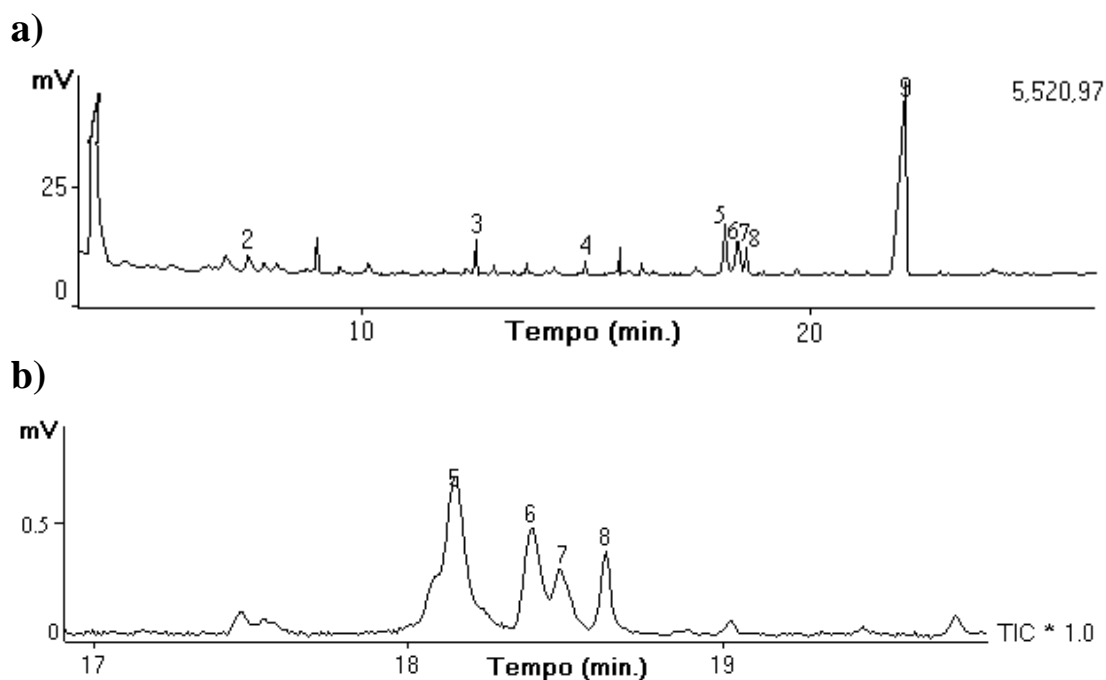


Figura 7 - a) CTI (cromatograma total de íons) obtido com extrato hexânico da glândula do feromônio de *Elamopalpus lignosellus*, usando-se uma coluna capilar de sílica fundida, SP 2340: 30 m x 0.25 mm; 0,25 μ m. b) Ampliação dos picos identificados.

Comparações com o tempo de retenção (t_r) e tempo de retenção relativo (rt_r) de todos os isômeros dos acetatos de (*Z*)/hexadecenila e (*E*)/hexadecenila foram feitas como mostra o Quadro 5 (Capítulo 2).

Em colunas polares como esta (SP 2340), os seis possíveis isômeros (Quadro 5 - Capítulo 2), candidatos a serem as substâncias representadas pelos picos 5, 6 e 7 (Figura 7(a) e (b)), apresentam tempo de retenção muito próximos, e, em muitos casos, são difíceis de serem separados em uma coluna. Em razão disso, tornou-se necessária a utilização do tempo de retenção relativo, que fornece resultado seguro, pelo fato de ser calculado através da subtração do tempo de retenção do padrão acetato pelo tempo de retenção de um padrão interno, neste caso, o hidrocarboneto tetradecano (C_{14}), presente em todos os padrões preparados e igualmente nos extratos de glândulas de feromônio.

Nessa análise, foram feitas comparações com o tempo de retenção relativo (rt_r), que mostrou maior eficiência quanto à identificação dos compostos no

extrato de glândulas, com relação ao tempo de retenção absoluto. Foi levado em consideração um desvio de $\pm 0,07$ min, do tempo de retenção relativo dos padrões de acetato hexadecenila, na comparação dos picos 5, 6 e 7 (Figura 7(b)).

Na Figura 7((a) e (b)), têm-se os picos previamente identificados através do tempo de retenção, quando comparados com o tempo de retenção dos padrões sintéticos, obtidos na coluna SP 2340 (30 m x 0,25 mm): pico 5 ($t_r = 18,140$ min), pico 6 ($t_r = 18,388$ min) e pico 7 ($t_r = 18,477$ min).

O pico 5 apresentou tempo de retenção relativo (rt_r) igual a 14,056 min, mais próximo dos acetatos (*E*)-8-AHD e (*E*)-9-AHD, sintéticos. O pico 6, mostrou tempo de retenção relativo (rt_r) igual a 14,304 min, mais próximo dos acetatos (*Z*)-9-AHD, (*Z*)-10-AHD e (*E*)-13-AHD, sintéticos. Já o pico 7 apresentou tempo de retenção relativo (rt_r) igual a 14,393 min, mais próximo do acetato (*Z*)-11-AHD, sintético, cromatografado sob as mesmas condições (Quadro 8).

Nota-se que a análise de extrato hexânico de glândula do *E. lignosellus* feita na coluna SP 2340 feita no “CG-EM”, quando comparada com a mesma análise na coluna DB5 no CG-DEA, apresentou três picos com tempo de retenção próximo ao dos padrões de acetatos de hexadecenila, bem como similaridade do espectro de massas dos picos 5, 6 e 7, comparado com o espectro de massas dos padrões de acetatos de hexadecenila.

Quadro 8 - Comparação do tempo de retenção relativo (rt_r) dos picos 5, 6 e 7 e dos padrões de acetatos de hexadecenila candidatos a serem os compostos desconhecidos nos extratos de glândulas *Elamopalpus lignosellus*

Substância	Tempo de retenção relativo (rt_r) (min)
Pico 5 (glândula)	14,06
(E)-8-AHD (sintético)	14,04
(E)-9-AHD (sintético)	14,07
Pico 6 (glândula)	14,30
(Z)-9-AHD (sintético)	14,27
(Z)-10-AHD (sintético)	14,34
(E)-1-13-AHD (sintético)	14,28
Pico 7 (glândula)	14,039
(Z)-11-AHD (sintético)	14,42

Os espectros de massas que representam os picos 5, 6 e 7 [Figura 7(b)] estão ilustrados nas Figuras 8, 9 e 10. Os três espectros apresentaram alguns íons característicos, que estão presentes no espectro de massas de acetatos de hexadecenila.

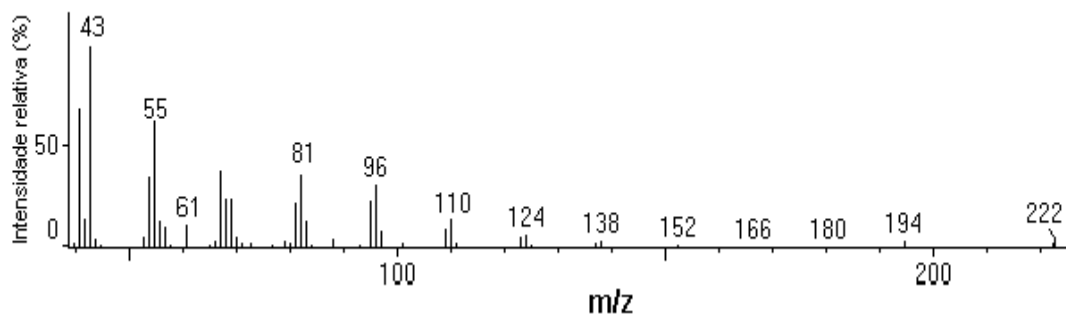


Figura 8 - Espectro de massas do pico 5 (Figura 7(b)) eluído em 18,140 min.

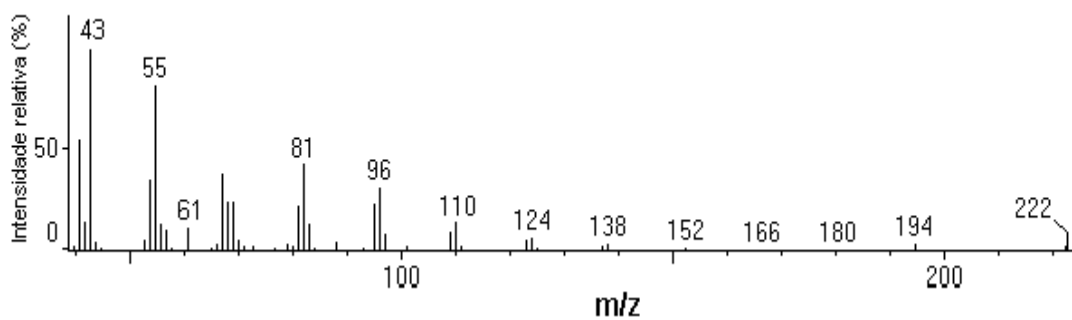


Figura 9 - Espectro de massas do pico 6 (Figura 7(b)) eluído em 18,388 min.

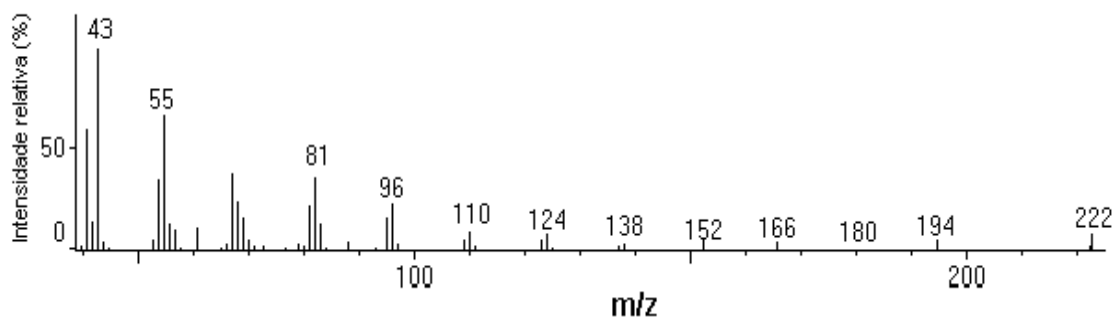


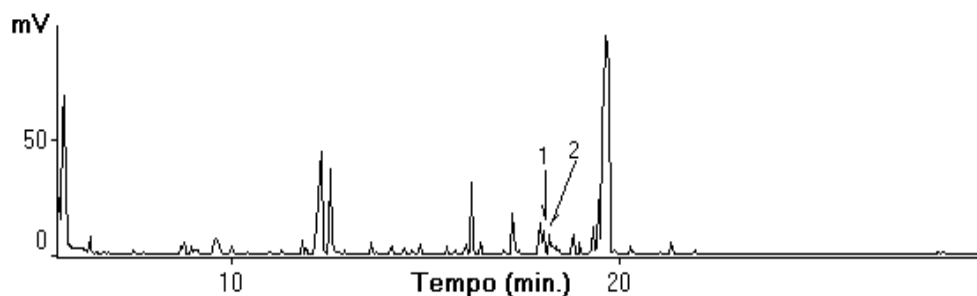
Figura 10 - Espectro de massas do pico 7 (Figura 7(b)) eluído em 18,477 min.

3.2. Identificação da posição da dupla ligação por derivatização com “DMDS”, dos acetatos presentes nos extratos de glândulas

A Figura 9(a) mostra o cromatograma total de íons (CTI); a Figura 9(b), a ampliação dos principais picos; e a Figura 10, o espectro de massas, do produto obtido da derivatização do extrato de glândula de *E. lignosellus* com “DMDS”, obtidos na coluna DB-1 (30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m).

O pico 1 (Figura 9(a) e (b)) apresentou tempo de retenção igual a 18,325 min e o pico 2 (Figura 9(a) e (b)), igual a 18,387 min. Em ambos os casos, os tempos de retenção dos picos desconhecidos estão próximos ao dos padrões sintéticos de acetato de hexadecenila derivatizados com “DMDS” e cromatografados sob as mesmas condições.

a)



b)

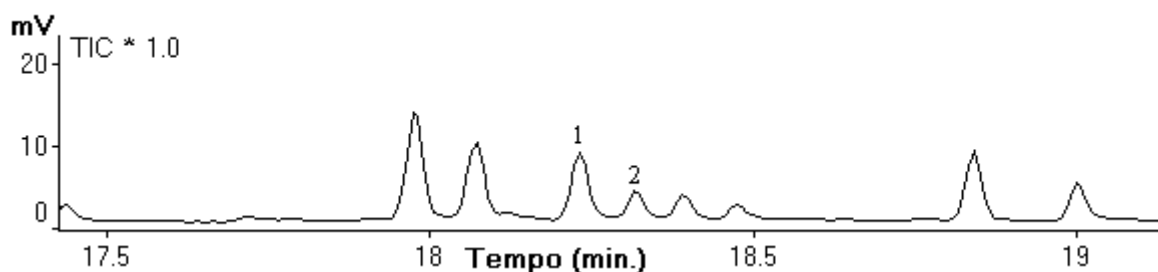


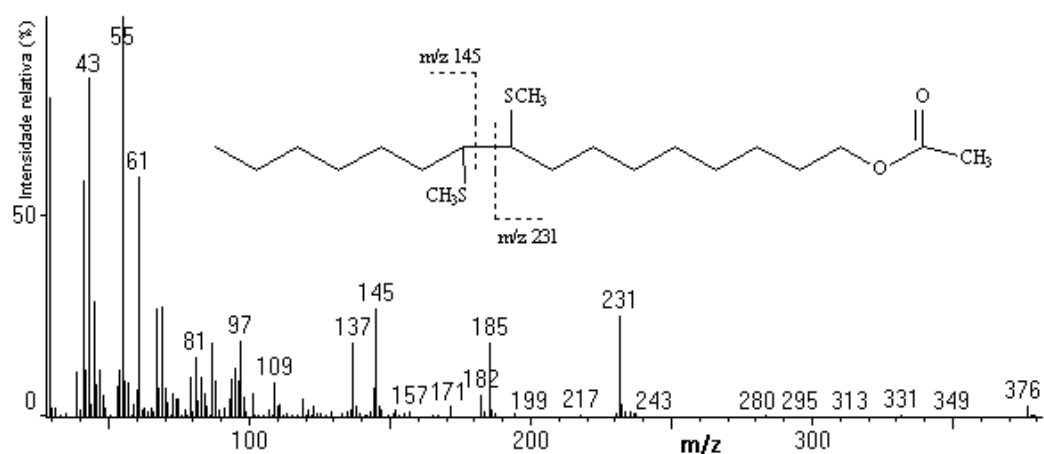
Figura 9 - a) CTI (cromatograma total de íons) obtido com extrato hexânico da glândula do feromônio de *Elasmopalpus lignosellus*, derivatizado com “DMDS”, usando-se uma coluna capilar de sílica fundida, DB-1: 30 m x 0.25 mm; 0,25 μ m. b) Ampliação dos picos identificados.

Na Figura 10(a) está representado o espectro de massas do pico 1 (Figura 9(b)), que apresenta o íon molecular m/z 376 (M^+ , 5,0%) e fragmentos em m/z 231 ($[\text{CH}_3\text{COOC}_{10}\text{H}_{20}\text{S}]^+$, 30%), m/z 145 ($[\text{C}_8\text{H}_{17}\text{S}]^+$, 28%), m/z 171 ($[\text{CH}_3\text{COOC}_{10}\text{H}_{20}\text{S}]^+ - \text{CH}_3\text{COOH}$, 5%), m/z 43 ($[\text{CH}_3\text{CO}]^+$, 100%) e m/z 61 ($[\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}_2]^+$, 58%), o que, em conjunto com outros fragmentos característicos e suas intensidades, indica ser o derivado de “DMDS” do acetato de (Z)-9-hexadecenila [(Z)-9-AHD].

Na Figura 10(b) está representado o espectro de massas do pico 2 (Figura 9(b)), que apresenta o íon molecular m/z 376 (M^+ , 2,0%) e fragmentos em m/z 259 ($[\text{CH}_3\text{COOC}_{12}\text{H}_{24}\text{S}]^+$, 20%), m/z 117 ($[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{S}]^+$, 22%), m/z 199 ($[\text{CH}_3\text{COOC}_{12}\text{H}_{24}\text{S}]^+ - \text{CH}_3\text{COOH}$, 5,0%), m/z 43 ($[\text{CH}_3\text{CO}]^+$, 100%), m/z 61 ($[\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}_2]^+$, 50%), o que, em conjunto com outros fragmentos característicos e suas intensidades, indica ser o derivado “DMDS” do acetato de (Z)-11-hexadecenila [(Z)-11-AHD].

O extrato de glândula 3 de *E. lignosellus* quando analisado no CG-EM, apresentou três picos (5, 6 e 7) (Figura 7(b)), sendo previamente identificados como (E)-9-AHD, (Z)-9-AHD e (Z)-11-AHD, respectivamente, através da comparação do tempo de retenção relativo destes compostos com os respectivos isômeros sintéticos do acetato de hexadecenila. Não foi possível identificar o composto (E)-9-AHD por meio da derivatização do extrato com “DMDS” e posterior análise em “CG-EM”, pois este não foi detectado. Isto é possível, pois existem relatos na literatura (ATTYGALLE et al., 1995 e 1996a; SVATOS et al., 1996), em que foi identificado um composto contendo três posições de dupla ligação em um acetato triinsaturado [acetato (3E, 8Z, 11Z)-tetradec-3,8,11-ila. No entanto, após ser feita a derivatização do composto com “DMDS” e a análise no “CG-EM”, só foi possível identificar duas posições da dupla ligação na estrutura [(Z)-8-TDA e (E)-3-TDA]. Entretanto, foram identificados as três posições, por meio da derivatização dos padrões de acetatos monoinsaturados, com a mesma posição da dupla ligação, referente ao composto.

a) PICO 1



b) PICO 2

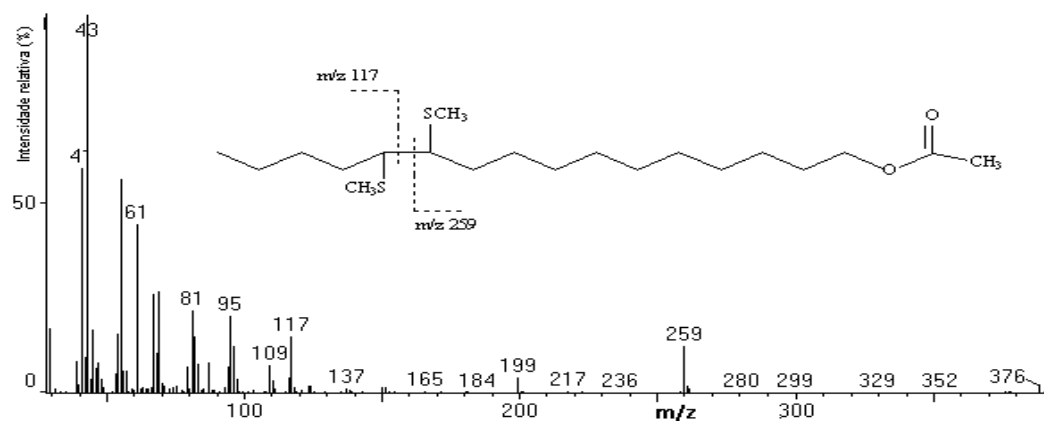


Figura 10 - a) Espectro de massas do pico 1 - derivado de “DMDS”. b) Espectro de massas do pico 2 - derivado de “DMDS”.

Os resultados aqui obtidos são completamente diferentes dos obtidos por LYNCH et al. (1984), em que foi relatada a identificação de 10 compostos (2 acetatos de tetradecenila, 2 acetatos de hexadecenila, 2 álcoois tetradecenol e 2 álcoois hexadecenol, 1 acetato de tetradecanila e 1 acetato de hexadecanila), nos extratos de glândulas de *E. lignosellus*, nos EUA. Isto é possível afirmar porque nos extratos analisados foram identificados somente dois compostos presentes no relato de LYNCH et al. (1984), sendo eles o (Z)-9-ATD e (Z)-11-AHD. Assim, acredita-se que haja diferença na composição ou na proporção dos diferentes componentes do feromônio sexual das populações de elasmos entre duas

diferentes localidades geográficas, como é o caso entre EUA e Brasil, ou que exista alguma subespécie dessa praga.

3.3. Atividade biológica dos extratos de glândula de feromônio de *E. lignoseluss* em “CG-DEA”

3.3.1. Extrato de glândula 1

3.3.1.1. Análise 1

A Figura 11 mostra o cromatograma-eletroantenograma, obtido no “CG-DEA”, utilizando coluna capilar de sílica fundida SP 2340 (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm).

Com o resultado obtido na Figura 11, foi comparado o tempo de retenção do pico 1 obtido no “CG-DEA” com o tempo de retenção dos possíveis isômeros dos acetatos (*E*)-10, (*E*)-11, (*E*)-12, (*Z*)-11 e (*Z*)-12-hexadecenila previamente identificados no “CG-EM” e analisados no “CG-DEA”.

Dessa forma, conseguiu-se comprovar que o componente que apresentou atividade na antena do inseto (pico 1) (Figura 11) foi o acetato (*Z*)-hexadec-11-enila [(*Z*)-11-AHD], e a antena do inseto respondeu ativamente a esse composto no eletroantenograma.

3.3.1.2. Análise 2

As Figuras 12 e 13 mostram o cromatograma, obtido na coluna DB-5 (30 m x 0,32 mm; 0,25 µm), em análise feita no “CG-DEA”.

O pico 1 (Figura 12) apresentou tempo de retenção (21,04 min) mais próximo do acetato de (*Z*)-9-tetradecenila sintético (21,07 min) (Figura 13); e o pico 2 (Figura 12) apresentou tempo de retenção (24,55 min) mais próximo do acetato (*Z*)-11-hexadecenila (24,55 min) (Figura 13), cromatografado sob as mesmas condições no “CG-DEA”.

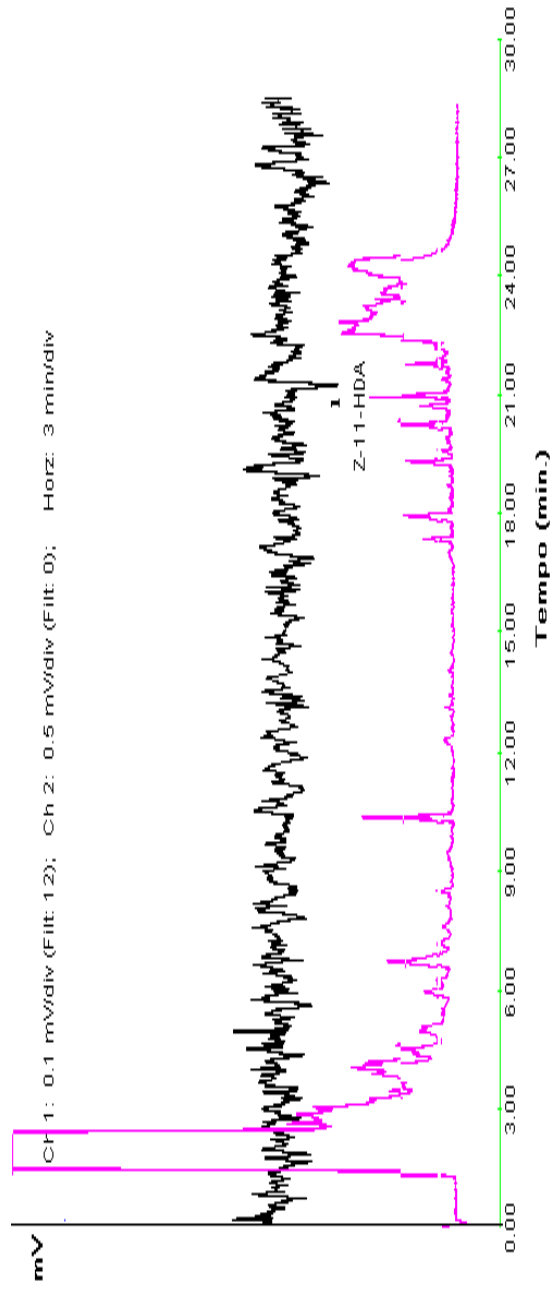


Figura 11 - Cromatograma-eletoantograma obtido com extrato hexânico da glândula do feromônio de *Elasmopalpus lignosellus*, usando-se uma coluna capilar de sílica fundida, SP 2340 (30 m x 0.25 mm).

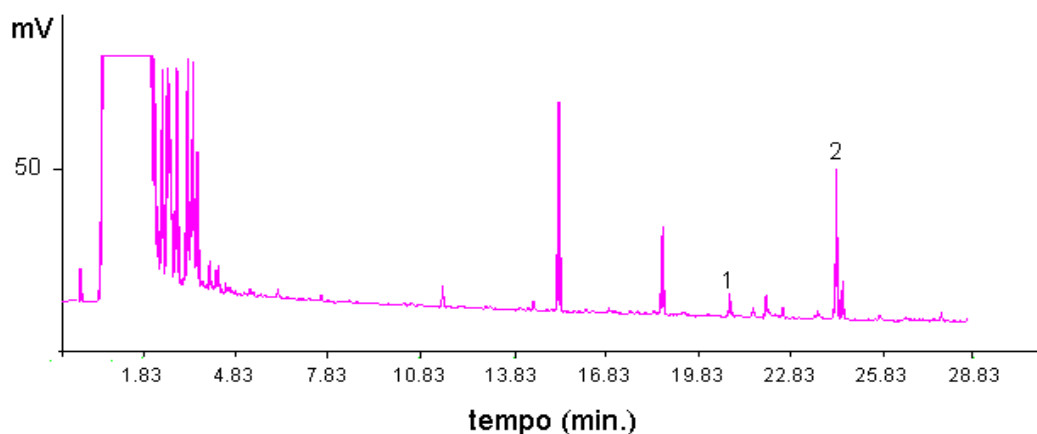


Figura 12 - Cromatograma obtido no “CG” com extrato hexânico da glândula do feromônio de *Elasmopalpus lignosellus*, usando-se uma coluna capilar de sílica fundida, DB-5 (30 m x 0,25 mm).

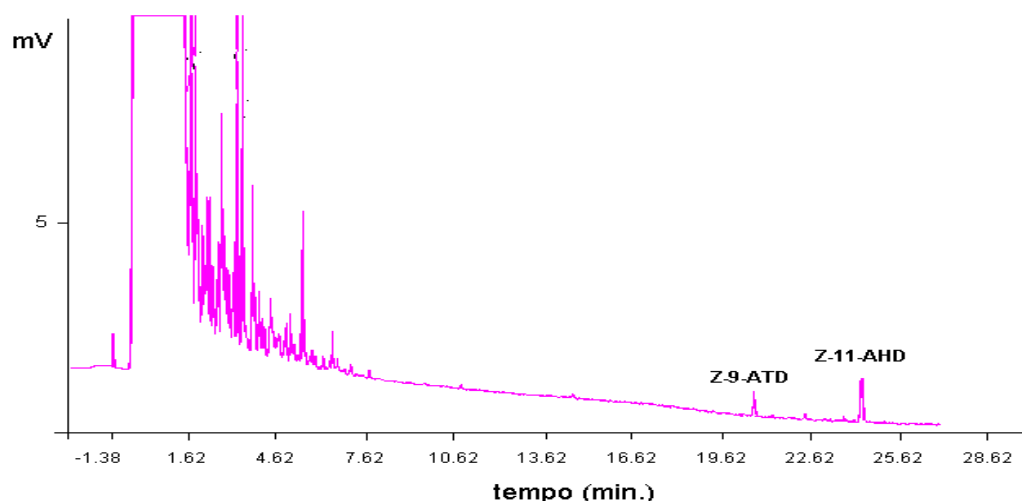


Figura 13 - Cromatograma obtido no “CG” com mistura de padrões de acetatos sintéticos [(Z)-9-ATD e (Z)-11-AHD], usando-se uma coluna capilar de sílica fundida, DB-5 (30 m x 0,32 mm; 0,25 µm filme).

As Figuras 14 e 15 mostram os cromatogramas-eletroantogramas, obtidos no “CG-DEA”, utilizando coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,32 mm; 0,25 µm), no laboratório de Síntese de Feromônios (DEQ-UFSCar/São Carlos/SP).

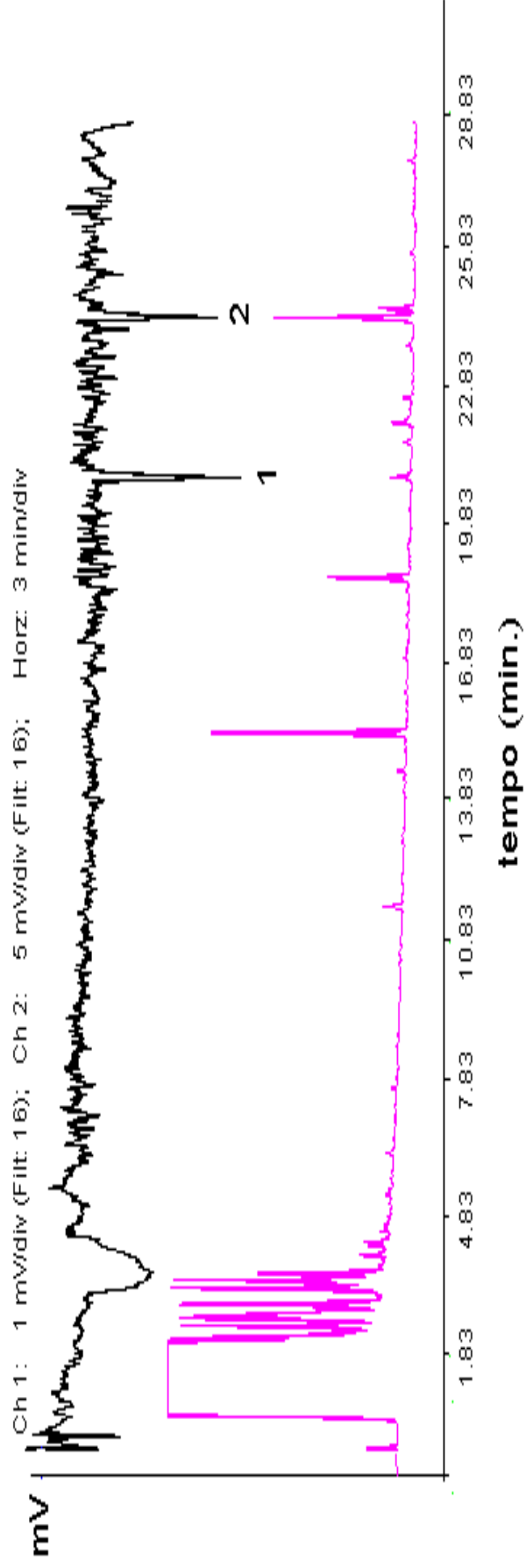


Figura 14 - Cromatograma-eletroantograma obtido com extrato hexânico da glândula do feromônio de *Elasmopalpus lignosellus*, usando-se uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,32 mm; 0,25 μ m).

Observando a Figura 14 notam-se duas respostas obtidas no “CG-DEA”, picos 1 e 2, a partir do extrato de *E. lignosellus*.

Comparando as Figuras 14 e 15, conseguiu-se comprovar que o composto (Z)-11-AHD (pico 2), antes identificado, mostrou-se novamente ativo à antena do inseto (macho) no “CG-DEA”. Entretanto, conseguiu-se pela primeira vez identificar a presença do composto (Z)-9-ATD (pico 1) em um extrato de glândula através do “CG-DEA” e, ao mesmo tempo, comprovar que esse é também um composto ativo, por meio da resposta obtida na antena de *E. lignosellus* (“CG-DEA”), pela análise feita com os padrões sintéticos (Z)-9-ATD e (Z)-11-AHD (Figura 15).

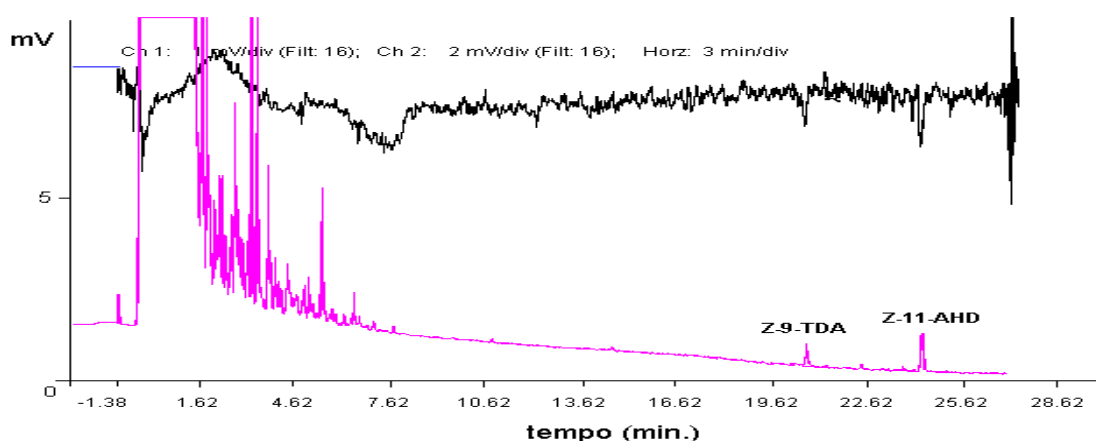


Figura 15 - Cromatograma-eletoantenograma obtido com padrões (Z)-9-ATD e (Z)-11-AHD, usando-se uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,32 mm; 0,25 μ m).

3.4. Análise das respostas dos padrões sintéticos na antena de *E. lignosellus* (macho) através de “Puffs”, no eletroantenograma

As Figuras 16, 17 e 18 mostram os compostos candidatos ao feromônio sexual de *E. lignosellus*, obtidos a partir da análise dos isômeros dos padrões de acetato de dodecenila (ADD), acetato de tetradecenila (ATD) e acetato de hexadecenila (AHD).

Na série do acetato de dodecenila (ADD), nenhum dos 19 isômeros testados provocou resposta nítida, indicando assim que os acetatos de dodecenila não mostraram atividade na antena do inseto (Figura 16).

Na série do acetato de tetradecenila (ATD), o acetato (Z)-9-tetradecenila [(Z)-9-ATD] provocou a maior resposta relativa na antena do inseto conectada no “DEA” (Figura 17), sugerindo que o composto poderá ser um forte candidato a componente da mistura feromonal. É importante notar que a resposta provocada por este composto está muito acima das respostas dos demais isômeros.

Da mesma forma, para a série do acetato de hexadecenila (AHD), o acetato de (Z)-11-hexadecenila [(Z)-11-AHD] provocou a maior resposta relativa na antena do inseto conectada no “DEA” (Figura 18). Estes dois compostos, pela sua atividade na antena do macho de *E. lignosellus*, são fortes candidatos à mistura feromonal. No entanto, há a possibilidade de que a antena perceba determinado composto, mas provoque comportamento diferente da atração desejada.

O “puff” feito no detector de eletroantenografia, com a série de padrões sintéticos dos acetatos monoinsaturados aqui mencionados, é uma forma de eliminar compostos que apresentam grande quantidade de isômeros em uma mesma série de padrões, através das respostas obtidas na antena do inseto conectada no eletroantenograma. Isso também foi relatado na literatura, por diversos autores, como identificação de feromônio de insetos (HILL et al., 1979; CHRISTENSEN et al., 1990; HO et al., 1996).

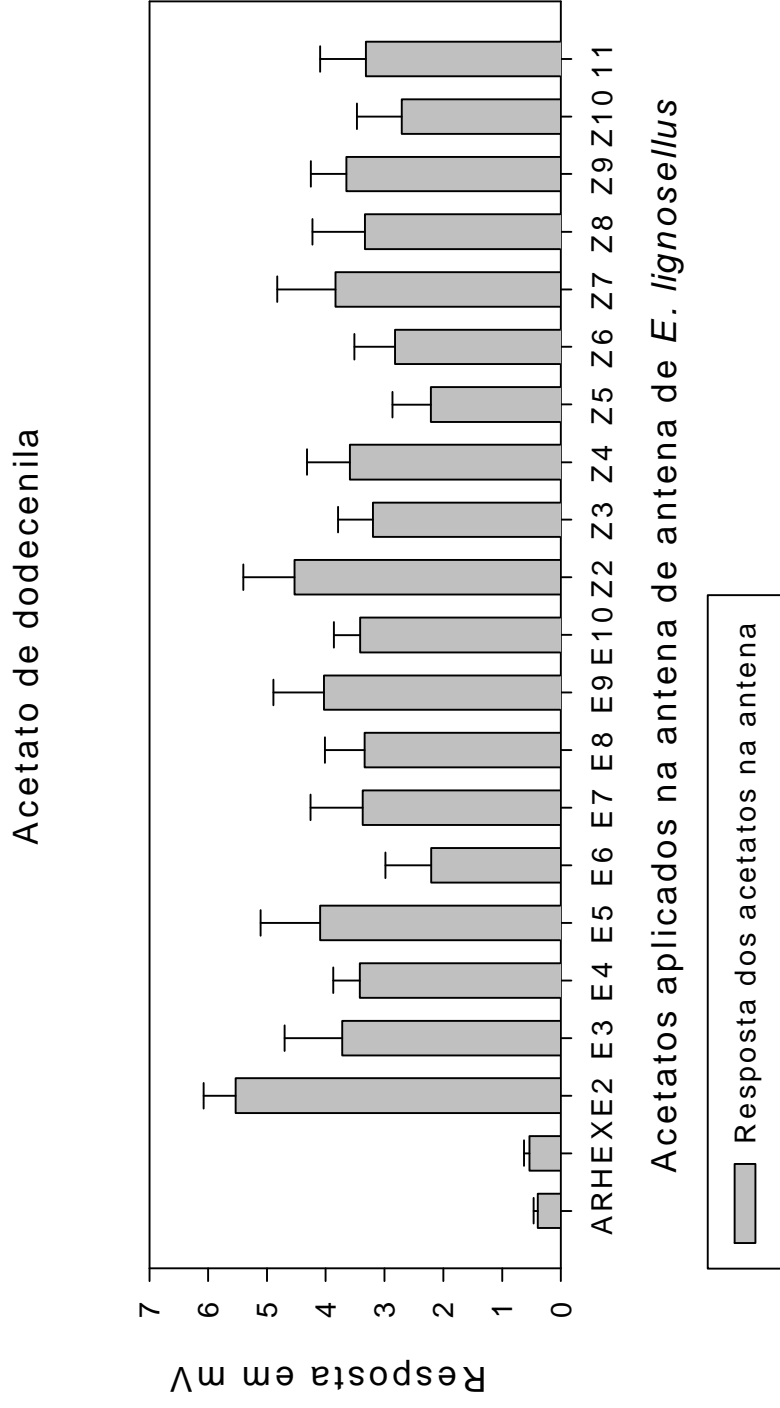


Figura 16 - Respostas dos isômeros do acetato (Z) e (E) de dodecenila (ADD) em antenas de machos de *Elasmopalpus lignosellus*, obtidos no eletroantenograma.

Acetato de tetradecenila

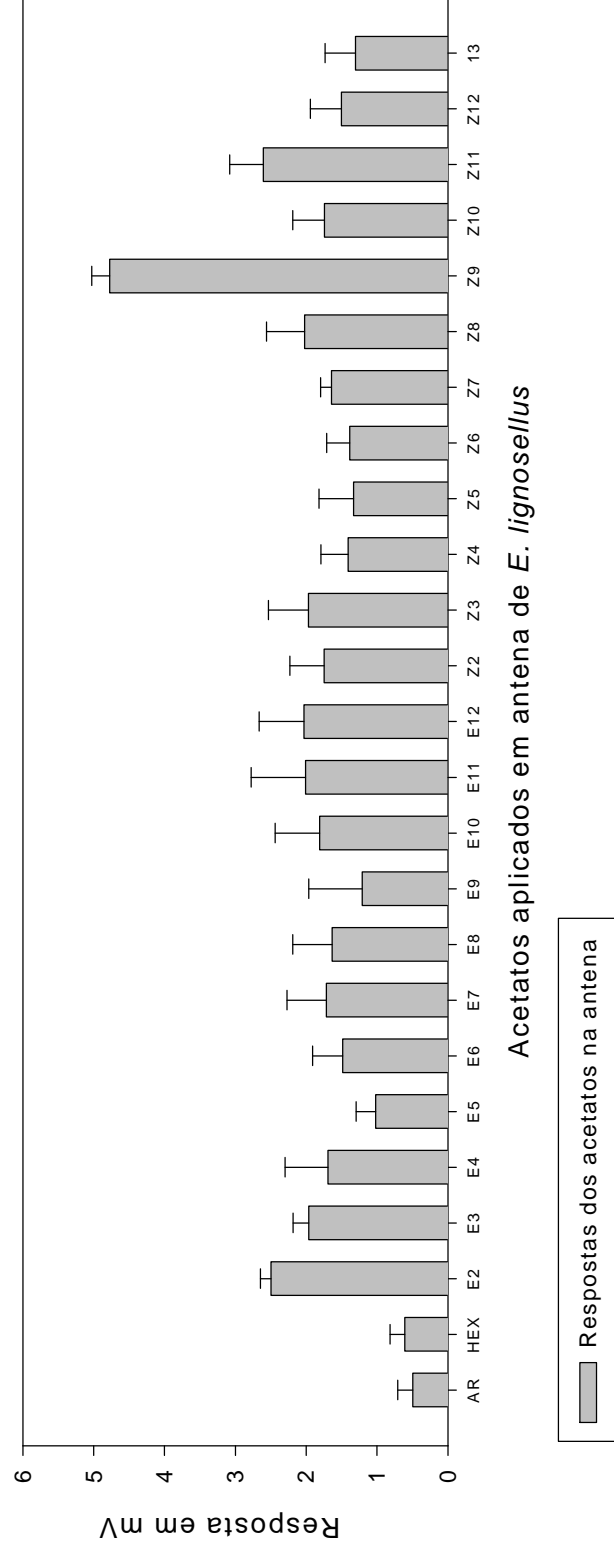


Figura 17 - Respostas dos isômeros do acetato (Z) e (E) de tetradecenila (ATD) em antenas de machos de *Elasmopalpus lignosellus*, obtidos no eletroantenograma.

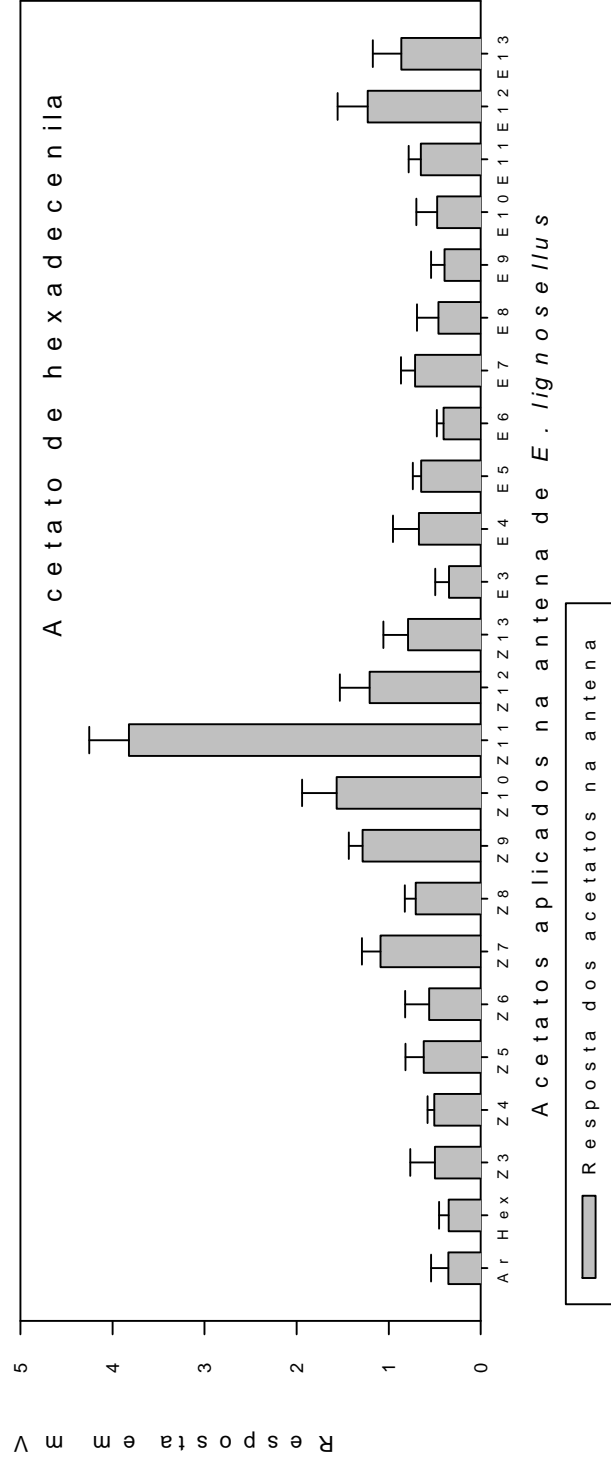


Figura 18 - Respostas dos isômeros do acetato (Z) e (E) de hexadecenila (AHD) em antenas de machos de *Elasmopalpus lignosellus*, obtidos no eletroantenograma.

4. RESUMO E CONCLUSÃO

Por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (“CG-EM”), foram identificados três acetatos presentes em extratos de glândulas de feromônio sexual de fêmeas virgens de *E. lignosellus*: (*E*)-hexadec-8-enila ou (*E*)-hexadec-9-enila, (*Z*)-hexadec-9-enila e (*Z*)-hexadec-11-enila. Entretanto, somente os dois últimos foram confirmados pela técnica de “DMDS”, utilizada para confirmação da posição da dupla ligação carbono-carbono.

Utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada à eletroantenografia (“CG-DEA”), foi possível verificar a atividade do acetato (*Z*)-hexadec-11-enila na antena do inseto, além de propiciar a descoberta de um acetato biologicamente ativo [(*Z*)-tetradec-9-enila], que não havia sido detectado no “CG-EM”.

Pode-se verificar que a identificação dos compostos candidatos a feromônio de insetos da ordem Lepidoptera nem sempre é possível somente por “CG-EM”. Entretanto, somente os bioensaios poderão afirmar a atividade biológica dos acetatos identificados.

Neste trabalho, foram estudados extratos de glândula de *E. lignosellus*, com o objetivo de identificar o feromônio sexual deste inseto aqui no Brasil, já que o feromônio de *E. lignosellus* identificado nos EUA (LYNCH et al., 1984) não demonstrou atividade para esse inseto brasileiro (PIRES et al., 1992). Até o

momento, só foi possível identificar quatro acetatos presentes nos extratos, dos quais dois mostraram-se ativos à antena do inseto no “CG-DEA”. Entretanto, ainda não se pode afirmar a atividade biológica desses compostos.

CAPÍTULO 2

DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE ACETATOS MONOINSATURADOS SIMILARES A FEROMÔNIOS DE INSETOS EM CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

RESUMO

SILVA, Alexsandro Araujo da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2001. **Determinação das propriedades de acetatos monoinsaturados similares a feromônios de insetos em cromatografia gasosa e espectrometria de massas.** Orientador: Gulab Newandram Jham. Conselheiros: Paulo Afonso Viana e Evaldo Ferreira Vilela.

Os tempos de retenção em cromatografia gasosa (t_r) de 76 acetatos lineares monoinsaturados (19 dodecenila, 23 tetradecenila, 22 hexadecenila e 12 octadecenila) foram obtidos em três colunas capilares de fases estacionárias, com polaridades diferentes [DB-1 (apolar), Supelcowax-10 (polar) e SP 2340 (altamente polar)]. Nenhuma das colunas foi capaz de separar todos os isômeros de uma cadeia determinada. Em geral, a melhor separação por cromatografia gasosa foi obtida na coluna SP 2340. Assim, estes dados foram utilizados na identificação preliminar de acetatos presentes em extratos de *Pseudaletia sequax* (Lepidoptera: Noctuidae). Os compostos previstos completamente por meio da comparação entre os tempo de retenção se mostraram subseqüentemente corretos através da determinação de padrão de fragmentação em espectrometria de massas

de derivados de “DMDS”. Também foram determinados padrões de fragmentação em espectrometria de massas destes 76 isômeros.

ABSTRACT

SILVA, Alexsandro Araujo da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, April, 2001. **Determination of gas chromatographic and mass spectrometric properties of a large collection of pheromone-like unsaturated acetates.** Adviser: Gulab Newandram Jham. Committee members: Paulo Afonso Viana and Evaldo Ferreira Vilela.

Gas chromatographic retention times (t_r) of 76 linear monounsaturated acetates were determined in three capillary columns on three stationary phases of different polarity [DB-1 (non-polar), Carbowax (Supelcowax-10) (polar) and SP 2340 (highly polar)] (dimensions: 30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m), using GC-MS (Shimadzu QP5000). None of the three columns evaluated was able to separate all the isomers of a given chain length in an analytically useful manner. Of the three phases, chromatography on the SP 2340 column provided the best separation of isomers. Therefore, relative retention times (rt_r) of authentic standards recorded from the SP 2340 column were used in the preliminary identification of acetates present in the pheromonal glands of *Pseudaletia sequax* (Lepidoptera: Noctuidae). The compounds predicted entirely by retention time data were subsequently shown to be correct by the determination of the mass spectra of their dimethyl disulfide

(DMDS) derivatives. The mass spectral fragmentation patterns of these 76 acetates were also determined.

1. INTRODUÇÃO

Misturas de feromônio têm sido identificadas e relatadas para várias espécies de insetos que economicamente são prejudiciais à agricultura. Isso ocorre, em especial, com insetos da ordem Lepidoptera e Hymenoptera (LANNE et al., 1985), que usam acetatos, álcoois e aldeídos insaturados de cadeia linear longa, com 12-20 átomos de carbonos, como componentes de seus sinais químicos, liberados durante a comunicação intra-específica. Estes compostos são usualmente encontrados em quantidades que variam de picogramas a microgramas por indivíduo, dependendo das espécies.

Acetatos monoinsaturados presentes em extratos de feromônio são freqüentemente identificados comparando-se o tempo de retenção dos compostos, com o tempo de retenção dos padrões, em colunas capilares com fases estacionárias de diferentes polaridades, e por meio da formação de derivados de “DMDS” (BUSER et al., 1983; VICENTI et al., 1987; ATTYGALLE et al., 1996a,b; GRIEPINK et al., 1996; PEPE et al., 1997), seguindo para a identificação dos compostos por “CG-EM”.

Feromônios contendo compostos poliinsaturados também podem ser identificados pelo método de redução com $\text{NH}_2\text{NH}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ a compostos monoinsaturados e posterior formação de derivados de “DMDS”, a fim de

determinar as posições das duplas ligações (ATTYGALLE et al., 1995 e 1996a; SVATOS et al., 1996)

O tempo de retenção (KOUTEK et al., 1992, 1997) e o índice de retenção de Kovats (MARQUES et al., 2000) de vários acetatos monoinsaturados foram relatados. No entanto, suas utilidades para identificação de feromônio, não foram avaliadas.

Razões de fragmentos de espectros de massas foram relatadas para vários padrões de acetatos monoinsaturados (HORIIKE et al., 1981; HORIIKE e HIRANO, 1987; LEBEDEVA et al., 1991). LARNE et al. (1985) utilizaram razões das intensidades do espectro de massas de alguns acetatos monoinsaturados, de 12-16 átomos de carbono, para distinguir isômeros posicionais e as aplicaram na identificação de acetatos desconhecidos em feromônio de insetos. No entanto, esse método não pode distinguir isômeros geométricos.

Assim, apesar da importância dos acetatos monoinsaturados na identificação de feromônio em lepidópteros, existe pouca informação no que se refere à fragmentação em espectro de massas destes padrões. Também não há informação completa sobre o uso de melhor coluna capilar, capaz de separar a maior parte dos isômeros desses acetatos.

Somente alguns laboratórios têm acesso aos padrões autênticos de todos os possíveis isômeros de acetatos monoinsaturados; assim, a construção de um banco de dados dos espectros de massas desses acetatos seria muito útil.

Dessa forma, serão relatados aqui dados de tempo de retenção referentes aos isômeros Z/E dos 76 acetatos monoinsaturados comercializados, com 99% de pureza (IPP, Holanda): acetato de dodecenila (19), acetato de tetradecenila (23), acetato de hexadecenila (22) e acetato de octadecenila (12), obtidos em três colunas capilares de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) de diferentes polaridades: DB-1 (apolar - J e W Scientific), Supelcowax-10 (polaridade intermediária - Supelco) e SP-2340 (altamente polar - Supelco). Os dados foram obtidos em um "CG-EM" (Shimadzu QP5000), com auto injetor, um sistema de detecção quadrupolar e um sistema para aquisição de dados (Class 5000). Os dados de

espectro de massas para os padrões de acetatos foram utilizados para criação de um banco de dados, atualmente inexistente na literatura.

Os dados de tempo de retenção e espectro de massas foram aplicados para identificação de acetatos presentes em extratos hexânicos de glândulas de *E. lignosellus* e *P. sequax*. A confirmação de cada composto similar ao feromônio de *P. sequax* e *E. lignosellus* foi feita reagindo os extratos com “DMDS” e analisando-os posteriormente em “CG-EM”.

A utilidade do banco de dados criado foi confirmada através da identificação de acetatos presentes em extratos de glândula de *P. sequax* e de *E. lignosellus*, pragas que causam danos econômicos a várias culturas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Extração do feromônio

A extração do feromônio de glândula de *E. lignosellus* e *P. sequax* foi feita de acordo com o descrito no item 2.2. - capítulo 1 deste trabalho.

2.2. Instrumentação

Os padrões e extratos preparados foram analisados em um “CG-EM” QP5000, com um sistema quadrupolar de detecção, e “GC-17A” com auto-injetor (AOC-17) da Shimadzu e um sistema de aquisição de dados Class 5000.

2.3. Preparação dos padrões para análise

Os acetatos monoinsaturados de 12-18 carbonos foram adquiridos, com 99% de pureza (IPP, Holanda), tendo cada isômero cerca de 100 mg ou 100 µL. Conseguiu-se um total de 76 acetatos monoinsaturados, sendo divididos em 19 acetatos de dodecenila (ADD), 23 acetatos de tetradecenila (ATD), 22 acetatos de hexadecenila (AHD) e 12 acetatos de octadecenila (AOD).

De cada padrão concentrado de acetato monoinsaturado foi retirada uma alíquota de 1 μL (1 mg) e dissolvida em 1 mL de hexano P.A., bidestilado, contido em um frasco de vidro de 1,5 mL, previamente rotulado. Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 5 μL (5 μg) de cada solução preparada e adicionada em frascos de vidro, previamente rotulados, contendo 1 mL de hexano P.A., bidestilado, obtendo-se assim soluções-padrões com concentrações de 5 ng/ μL , sendo injetado 1 μL (5 ng) de cada padrão no “CG-EM”, conforme condições descritas no Quadro 1. Em cada frasco foram adicionados dois padrões de hidrocarbonetos, tetradecano (C_{14}) e octacosano (C_{28}), com concentração final de 5 ng/ μL , com a finalidade de se calcular o tempo de retenção relativo de cada composto, em cada coluna.

Cada padrão foi injetado cinco vezes no “CG-EM”, de modo que se obtivesse a média do tempo de retenção e das intensidades relativas de seus respectivos espectros de massas.

A média dos dados de espectros de massas obtidos de cada padrão de acetato monoinsaturado foi utilizada para a criação de um banco de dados, no software CLASS 5000 do programa do “CG-EM”, de modo que auxiliasse na identificação de compostos desconhecidos similares ao feromônio de inseto.

2.4. Determinação do tempo de retenção e padrão de fragmentação dos acetatos monoinsaturados analisados em “CG-EM”

A análise e determinação do tempo de retenção e a obtenção dos espectros de massas de todos os padrões injetados no “CG-EM” foram realizadas nas condições descritas no Quadro 1.

2.5. Criação do banco de dados dos acetatos monoinsaturados de 12-18 átomos de carbono

O espectro de massas de cada acetato analisado foi arquivado em uma biblioteca no software CLASS 5000 do programa do “CG-EM”, a fim de se

avaliar sua utilidade na identificação desses acetatos em extratos de glândulas de *E. lignosellus* e *P. sequax*.

2.6. Identificação dos compostos desconhecidos presentes nos extratos brutos de glândulas de *Elasmopalpus lignosellus* e *Pseudaletia sequax*, injetados no “CG-EM”

A identificação dos compostos desconhecidos presentes nos extratos foi feita da seguinte forma:

1) Por meio da comparação do tempo de retenção dos compostos desconhecidos com o tempo de retenção dos padrões sintéticos anteriormente analisados.

2) Por meio da comparação dos fragmentos de massas dos compostos presentes nos extratos com os fragmentos de massas dos padrões pré-analisados e arquivados em uma biblioteca no software do “CG-EM”.

3) Pela derivatização dos extratos com “DMDS” e posterior análise no “CG-EM”, sob as condições descritas no Quadro 2.

4) Por meio da confirmação dos acetatos identificados nos extratos de *E. lignosellus* e *P. sequax* através do banco de dados desenvolvido no “CG-EM”.

2.7. Preparo de derivados e condições de análise

Os compostos (padrões) foram analisados com cinco repetições, por um “CG-EM” QP5000 em *splitless*, com um sistema quadrupolar de detecção, e por um “GC-17A” com auto-injetor (AOC-17) da Shimadzu e um sistema de aquisição de dados Class 5000. Todos os compostos foram analisados em três colunas capilares de polaridades diferentes, de 30 m x 0,25 mm; 0,25 µm, (DB-1, J e W Scientific; Supelcowax-10, Supelco; SP 2340, Supelco).

Os compostos similares a feromônio identificados nos extratos analisados foram confirmados através da formação de derivados com a adição de “DMDS” (BUSER et al., 1983), de acordo com o procedimento descrito no capítulo 1.

Quadro 1 - Condições de cromatografia gasosa/espectrometria de massas (“CG-EM”) usadas para análise de padrões de acetatos de dodecenila, tetradecenila, hexadecenila e octadecenila e extrato bruto de glândulas de feromônio de *Elasmopalpus lignosellus* e *Pseudaletia sequax*

Parâmetros	Condições
Colunas	DB-1: 30 m x 0,25 mm ID; 0,25 µm filme Supelcowax-10: 30 m x 0,25 mm ID; 0,25 µm filme SP 2340: 30 m x 0,25 mm ID; 0,25 µm filme
Temperatura inicial (coluna)	60°C-
Temperatura final (coluna)	DB-1: 280°C (5 min) Supelcowax-10: 240°C (10 min) SP 2340: 230°C (1 min)
Variação da temperatura	6°C/min
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Fluxo de gás	1 mL/min
Temperatura do injetor	220°C
Temperatura da interface	250°C
Modo de ionização	Impacto de elétrons
Voltagem de aceleração	70 eV
Faixa de massas (m/z)	29 - 400

Quadro 2 - Condições de cromatografia gasosa/espectrometria de massas (“CG-EM”) usadas para análise de derivados de “DMDS” dos extratos brutos de glândulas de feromônio de *Elasmopalpus lignosellus* e *Psedaletia sequax*

Parâmetros	Condições
Coluna	DB-1: 30 m x 0,25 mm ID; 0,25 µm filme
Temperatura inicial (coluna)	100°C
Temperatura final (coluna)	DB-1: 320°C (1 min)
Variação da temperatura	6°C/min
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Fluxo de gás	1 mL/min
Temperatura do injetor	220°C
Temperatura da interface	280°C
Modo de ionização	Impacto de elétrons
Faixa de massas (m/z)	29 - 420
Voltagem de aceleração	70 eV

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram apresentados em três partes:

- 1) Tempo de retenção e padrão de fragmentação dos acetatos monoinsaturados analisados no “CG-EM”.
- 2) Utilização do tempo de retenção e padrão de fragmentação para identificação de acetatos em extrato de glândulas de *P. sequax*.
- 3) Utilização do banco de dados para identificação de acetatos em extratos de glândulas de *P. sequax* e *E. lignosellus*.

3.1. Tempo de retenção e padrão de fragmentação dos acetatos monoinsaturados analisados em “CG-EM”

Acetatos monoinsaturados presentes em extrato de glândula de feromônio, freqüentemente, são identificados comparando-se o tempo de retenção dos compostos no “CG”, em fases estacionárias de diferentes polaridades, com o tempo de retenção de seus padrões.

É possível encontrar um total de 100 isômeros dos acetatos ADD, ATD, AHD e AOD, e seria ideal se todos os isômeros pudessem ser separados em uma ou mais colunas capilares no “CG”.

As colunas utilizadas no experimento aqui relatado - DB-1 (J e W Scientific, Supelcowax-10 (Supelco) e SP 2340 (Supelco) (Quadros 3 a 6), ambas de 30 m x 0,25 mm e 0,25 μ m - foram escolhidas para se determinar os tempos de retenção absoluto (t_r) e relativo (rt_r) dos padrões de acetatos monoinsaturados de 12 a 18 carbonos, pelo fato de essas fases estacionárias serem amplamente utilizadas, sem saber o poder de resolução para isômeros de acetatos monoinsaturados.

Todos os possíveis isômeros ADD e ATD foram avaliados, porém somente 22 dos 27 isômeros de AHD e 12 dos 31 isômeros de AOD existentes foram avaliados, em razão de os demais não estarem disponíveis comercialmente.

Obteve-se excelente reprodutibilidade do tempo de retenção relativo (rt_r) e do tempo de retenção absoluto (t_r) em todas as colunas utilizadas; no entanto, nas três colunas avaliadas, não foi possível separar todos os isômeros dos padrões de acetatos aqui analisados.

Tendo-se injetado todos os padrões disponíveis comercialmente de acetatos monoinsaturados de 12 a 18 átomos de carbono, nas três colunas com fase estacionária de polaridades diferentes - DB-1, Supelcowax-10 e SP 2340 - necessitar-se-ia de uma coluna que melhor separasse os isômeros quando presentes em uma mistura, como, por exemplo, em um extrato bruto de feromônio de glândulas.

Para avaliar a capacidade de separação de cada coluna, foram examinados o rt_r e o t_r (Quadro 3 a 6); se dois compostos adjacentes apresentassem uma diferença de 0,07 min, eram considerados resolvidos.

Verificou-se então que a coluna SP 2340 apresentou melhor poder de separação, devido aos melhores resultados obtidos tanto nos cromatogramas quanto nos dados de t_r e rt_r , além de apresentar melhor resolução (R_s) entre dois picos adjacentes.

Outros fatores levaram a esse resultado. Por exemplo, a análise do extrato de glândula feita na coluna DB-1 apresentou apenas um pico na região do tempo de retenção (t_r) dos isômeros do acetato hexadecenila, enquanto na coluna SP 2340 o mesmo extrato, apresentou três picos na região do acetato hexadecenila, indicando que o único pico representado na DB-1, na verdade, eram três isômeros do acetato hexadecenila que não foram separados pela DB-1, mas que o foram pela coluna SP 2340.

Entretanto, geralmente se torna necessário o uso das três colunas com fases estacionárias de polaridades diferentes, para facilitar a identificação de componentes de feromônio de insetos.

De acordo com os Quadro 3 a 6, nos quais têm-se os padrões em ordem crescente de eluição a partir do tempo de retenção relativo (rt_r), verificou-se que a ordem de eluição entre os padrões de mesmo número de carbono diferencia quando se comparam os valores entre as colunas.

Dessa forma, aumenta-se a possibilidade de identificação de um composto no caso de este ser um acetato monoinsaturado de mesmo número de carbono, presente em um extrato bruto de feromônio de glândula, quando obtido nas três colunas.

Os Quadros 3 a 6, a seguir, representam o tempo de retenção absoluto (t_r) e o tempo de retenção relativo (rt_r) dos padrões, em ordem crescente de eluição, de acetatos monoinsaturados (Z e E): dodecenila (ADD), tetradecenila (ATD), hexadecenila (AHD) e octadecenila (AOD).

O tempo de retenção relativo (rt_r) de cada padrão, obtido em cada coluna, foi calculado através da subtração do tempo de retenção absoluto de cada padrão de acetato pelo tempo de retenção do padrão interno utilizado na análise: tetradecano (C_{14}).

Quadro 3 - Tempo de retenção (t_r) e tempo de retenção relativo (rt_r), ambos em ordem crescente de eluição, de acetatos (Z e E) de dodecenila (ADD), em três colunas capilares de polaridades diferentes

N ^o	COLUNAS								
	PADRÕES	DB-1		PADRÕES	SUPELCOWAX-10		PADRÕES	SP 2340	
		rt_r (min)	t_r (min)		rt_r (min)	t_r (min)		rt_r (min)	t_r (min)
1	(Z)-4ADD	3,46	17,66	(Z)-4ADD	10,06	18,29	(Z)-4ADD	7,12	13,08
2	(Z)-3ADD	3,55	17,76	(E)-3ADD	10,13	18,36	(E)-3ADD	8,62	12,80
3	(Z)-5ADD	3,57	17,77	(Z)-3ADD	10,18	18,41	(E)-4ADD	8,76	12,93
4	(Z)-6ADD	3,58	17,77	(E)-4ADD	10,22	18,45	(Z)-3ADD	8,83	13,02
5	(E)-3ADD	3,61	17,78	(Z)-5ADD	10,28	18,51	(Z)-2ADD	8,87	13,05
6	(E)-5ADD	3,64	17,80	(Z)-2ADD	10,29	18,51	(E)-5ADD	8,93	13,09
7	(E)-4ADD	3,65	17,81	(E)-5ADD	10,31	18,54	(E)-6ADD	9,00	13,17
8	(Z)-2ADD	3,67	17,88	(E)-6ADD	10,33	18,56	(E)-7ADD	9,03	13,20
9	(E)-6ADD	3,69	17,85	(Z)-6ADD	10,35	18,57	(E)-8ADD	9,06	13,23
10	(Z)-7ADD	3,70	17,90	(E)-7ADD	10,39	18,62	(Z)-5ADD	9,13	13,31
11	(E)-7ADD	3,72	17,88	(E)-8ADD	10,41	18,64	(E)-2ADD	9,19	13,36
12	(E)-8ADD	3,76	17,93	(Z)-7ADD	10,47	18,69	(E)-9ADD	9,20	13,36
13	11ADD	3,81	18,00	(E)-9ADD	10,59	18,82	(Z)-6ADD	9,21	13,39
14	(Z)-8ADD	3,81	18,01	(Z)-8ADD	10,62	18,84	(Z)-7ADD	9,32	13,50
15	(E)-9ADD	3,86	18,02	(Z)-9ADD	10,78	19,00	(Z)-8ADD	9,43	13,61
16	(E)-2ADD	3,90	18,06	11ADD	10,78	19,01	(E)-10ADD	9,53	13,69
17	(Z)-9ADD	3,92	18,12	(E)-2ADD	10,82	19,05	(Z)-9ADD	9,55	13,73
18	(E)-10ADD	4,03	18,19	(E)-10ADD	10,99	19,22	11ADD	9,55	13,74
19	(Z)-10ADD	4,27	18,47	(Z)-10ADD	11,34	19,56	(Z)-10ADD	9,99	14,18

Quadro 4 - Tempo de retenção (t_r) e tempo de retenção relativo (rt_r), ambos em ordem crescente de eluição, de acetatos (Z e E) de tetradecenila (ATD), em três colunas capilares de polaridades diferentes

N ^o	COLUNAS								
	PADRÕES	DB-1		PADRÕES	SUPELCOWAX-10		PADRÕES	SP 2340	
		rt_r (min)	t_r (min)		rt_r (min)	t_r (min)		rt_r (min)	t_r (min)
1	(Z)-4ATD	7,29	21,49	(Z)-4ATD	13,61	21,83	(Z)-4ATD	9,22	15,71
2	(Z)-6ATD	7,32	21,52	(E)-3ATD	13,70	21,92	(E)-3ATD	11,29	15,47
3	(Z)-5ATD	7,35	21,55	(Z)-3ATD	13,75	21,97	(E)-4ATD	11,41	15,57
4	(Z)-7ATD	7,38	21,58	(E)-4ATD	13,77	22,00	(Z)-3ATD	11,48	15,67
5	(Z)-3ATD	7,39	21,59	(Z)-5ATD	13,77	22,00	(Z)-2ATD	11,53	15,71
6	(E)-5ATD	7,43	21,59	(Z)-6ATD	13,78	22,00	(E)-5ATD	11,55	15,72
7	(E)-3ATD	7,44	21,60	(E)-6ATD	13,82	22,05	(E)-6ATD	11,58	15,75
8	(Z)-8ATD	7,44	21,64	(E)-5ATD	13,83	22,06	(E)-7ATD	11,59	15,76
9	(E)-6ATD	7,46	21,62	(E)-7ATD	13,83	22,07	(E)-8ATD	11,67	15,83
10	(E)-7ATD	7,46	21,63	(Z)-7ATD	13,85	22,07	(Z)-5ATD	11,71	15,89
11	(E)-4ATD	7,47	21,63	(Z)-2ATD	13,85	22,08	(E)-9ATD	11,73	15,89
12	(E)-8ATD	7,49	21,66	(E)-8ATD	13,89	22,12	(E)-10ATD	11,73	15,89
13	(Z)-2ATD	7,50	21,71	(Z)-8ATD	13,94	22,17	(Z)-6ATD	11,74	15,92
14	(Z)-9ATD	7,54	21,73	(E)-9ATD	13,97	22,20	(Z)-7ATD	11,82	16,00
15	(E)-9ATD	7,56	21,72	(E)-10ATD	13,99	22,22	(E)-2ATD	11,82	15,99
16	(E)-10ATD	7,60	21,77	(Z)-9ATD	14,05	22,28	(E)-11ATD	11,85	16,02
17	13ATD	7,64	21,83	(E)-11ATD	14,14	22,37	(Z)-8ATD	11,89	16,08
18	(Z)-10ATD	7,66	21,85	(Z)-10ATD	14,19	22,41	(Z)-10ATD	12,09	16,27
19	(E)-11ATD	7,67	21,83	13ATD	14,33	22,55	(Z)-9ATD	12,13	16,32
20	(E)-2ATD	7,70	21,85	(Z)-11ATD	14,34	22,56	(E)-12ATD	12,16	16,32
21	(Z)-11ATD	7,75	21,95	(E)-2ATD	14,34	22,57	(Z)-11ATD	12,18	16,36
22	(E)-12ATD	7,83	21,99	(E)-12ATD	14,52	22,74	13ATD	12,19	16,37
23	(Z)-12ATD	8,07	22,26	(Z)-12ATD	14,86	23,09	(Z)-12ATD	12,61	16,79

Quadro 5 - Tempo de retenção (t_r) e tempo de retenção relativo (rt_r), ambos em ordem crescente de eluição, de acetatos (Z e E) de hexadecenila (AHD) em três colunas capilares de polaridades diferentes

Nº	COLUNAS								
	PADRÕES	DB-1		PADRÕES	SUPELCOWAX-10		PADRÕES	SP 2340	
		rt_r (min)	t_r (min)		rt_r (min)	t_r (min)		rt_r (min)	t_r (min)
1	(Z)-6AHD	10,78	24,98	(Z)-4AHD	16,92	25,14	(E)-3AHD	13,76	17,93
2	(Z)-4AHD	10,80	25,00	(E)-3AHD	16,99	25,22	(E)-4AHD	13,86	18,03
3	(Z)-7AHD	10,81	25,01	(Z)-6AHD	17,02	25,24	(Z)-3AHD	13,94	18,12
4	(Z)-5AHD	10,83	25,02	(Z)-5AHD	17,04	25,26	(E)-5AHD	13,98	18,14
5	(Z)-8AHD	10,83	25,03	(Z)-3AHD	17,05	25,28	(Z)-4AHD	13,98	18,15
6	(Z)-9AHD	10,88	25,08	(Z)-7AHD	17,05	25,27	(E)-7AHD	13,99	18,16
7	(Z)-3AHD	10,90	25,10	(E)-4AHD	17,06	25,29	(E)-6AHD	13,99	18,16
8	(E)-5AHD	10,91	25,07	(E)-6AHD	17,08	25,30	(E)-8AHD	14,04	18,20
9	(E)-7AHD	10,91	25,07	(E)-7AHD	17,08	25,31	(E)-9AHD	14,07	18,23
10	(E)-8AHD	10,92	25,08	(Z)-8AHD	17,09	25,32	(Z)-5AHD	14,10	18,29
11	(E)-6AHD	10,92	25,08	(E)-8AHD	17,10	25,33	(Z)-6AHD	14,12	18,30
12	(E)-3AHD	10,93	25,10	(E)-5AHD	17,10	25,33	(E)-10AHD	14,12	18,28
13	(E)-4AHD	10,95	25,12	(E)-9AHD	17,14	25,37	(Z)-7AHD	14,17	18,35
14	(Z)-10AHD	10,96	25,16	(Z)-9AHD	17,15	25,38	(E)-11AHD	14,18	18,34
15	(E)-9AHD	10,96	25,13	(E)-10AHD	17,19	25,43	(E)-12AHD	14,19	18,35
16	(E)-10AHD	10,99	25,16	(Z)-10AHD	17,25	25,47	(Z)-8AHD	14,20	18,38
17	(Z)-11AHD	11,04	25,24	(E)-11AHD	17,26	25,49	(Z)-9AHD	14,27	18,46
18	(E)-11AHD	11,04	25,21	(E)-12AHD	17,28	25,51	(E)-13AHD	14,28	18,44
19	(E)-12AHD	11,09	25,25	(Z)-11AHD	17,35	25,58	(Z)-10AHD	14,34	18,53
20	(E)-13AHD	11,14	25,31	(E)-13AHD	17,42	25,64	(Z)-11AHD	14,42	18,61
21	(Z)-12AHD	11,15	25,34	(Z)-12AHD	17,49	25,71	(Z)-12AHD	14,52	18,71
22	(Z)-13AHD	11,24	25,43	(Z)-13AHD	17,62	25,84	(Z)-13AHD	14,60	18,78

Quadro 6 - Tempo de retenção (t_r) e tempo de retenção relativo (rt_r), ambos em ordem crescente de eluição, de acetatos (Z e E) de octadecenila (AOD), em três colunas capilares de polaridades diferentes

Nº	COLUNAS								
	PADRÕES	DB-1		PADRÕES	SUPELCOWAX-10		PADRÕES	SP 2340	
		rt_r (min)	t_r (min)		rt_r (min)	t_r (min)		rt_r (min)	t_r (min)
1	(Z)-9ODA	14,00	28,20	(E)-3ODA	20,05	28,28	(E)-3ODA	16,04	20,22
2	(Z)-11ODA	14,09	28,29	(Z)-9ODA	20,11	28,33	(Z)-3ODA	16,21	20,39
3	(E)-9ODA	14,10	28,26	(Z)-3ODA	20,12	28,34	(Z)-2ODA	16,23	20,41
4	(Z)-3ODA	14,11	28,31	(E)-9ODA	20,14	28,37	(E)-9ODA	16,27	20,43
5	(E)-3ODA	14,13	28,29	(E)-11ODA	20,20	28,43	(E)-11ODA	16,34	20,51
6	(E)-11ODA	14,16	28,32	(Z)-2ODA	20,21	28,43	(Z)-9ODA	16,42	20,61
7	(Z)-2ODA	14,20	28,41	(Z)-11ODA	20,22	28,45	(E)-13ODA	16,43	20,59
8	(E)-13ODA	14,23	28,40	(E)-13ODA	20,31	28,54	(E)-2ODA	16,47	20,64
9	(Z)-13ODA	14,25	28,44	(Z)-13ODA	20,41	28,64	(Z)-11ODA	16,51	20,70
10	(E)-15ODA	14,32	28,49	(E)-15ODA	20,44	28,67	(E)-15ODA	16,52	20,68
11	(E)-2ODA	14,34	28,49	(E)-2ODA	20,61	28,84	(Z)-13ODA	16,67	20,85
12	(Z)-15ODA	14,42	28,59	(Z)-15ODA	20,65	28,88	(Z)-15ODA	16,83	21,02

MARQUES et al. (2000) determinaram o índice de retenção de Kovats para os padrões de acetato de dodecenila (ADD), tetradecenila (ATD), hexadecenila (AHD) e octadecenila (AOD) em duas colunas capilares, uma apolar (DB-5) e outra intermediariamente polar (Carbowax 20). Entretanto, aquele estudo teria aplicação limitada, pois não pode ser aplicado na identificação de acetatos em extratos de glândulas de insetos, pelo fato de não conter dados de espectro de massas, fato confirmado na presente tese.

3.2. Utilização do tempo de retenção e padrão de fragmentação para identificação de acetatos em extrato de glândulas de *P. sequax*

Para confirmar que os dados deste trabalho podem ser muito úteis na prévia ou total identificação de acetatos monoinsaturados de 12 a 18 átomos de carbono, utilizar-se-á aqui, como exemplo, a análise de extrato de glândula de feromônio *P. sequax* sob as mesmas condições de análise utilizadas para os padrões de acetatos sintéticos.

3.2.1. Análises em extratos de glândulas de *Pseudaletia sequax*

Nas Figuras 1 e 2, encontram-se o cromatograma total de íons e a ampliação do cromatograma, respectivamente, de uma amostra de extrato bruto de feromônio de glândulas de *P. sequax*, utilizando uma coluna SP 2340.

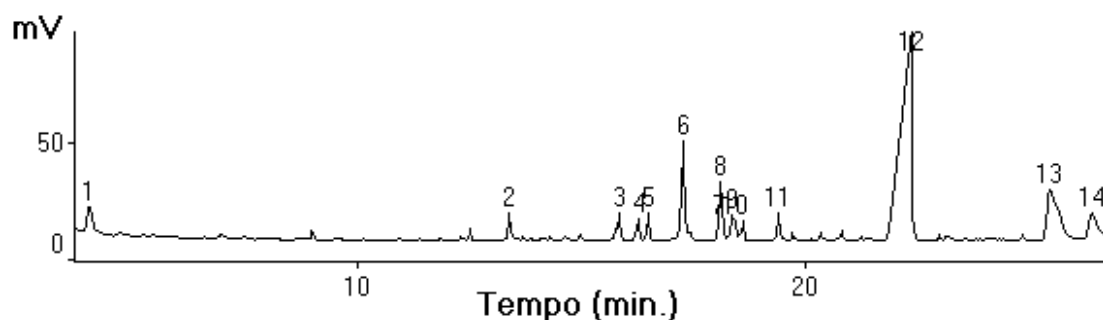


Figura 1 - Cromatograma total de íons (CTI) de extrato de *Pseudaletia sequax*, obtido na coluna SP 2340 (30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m).

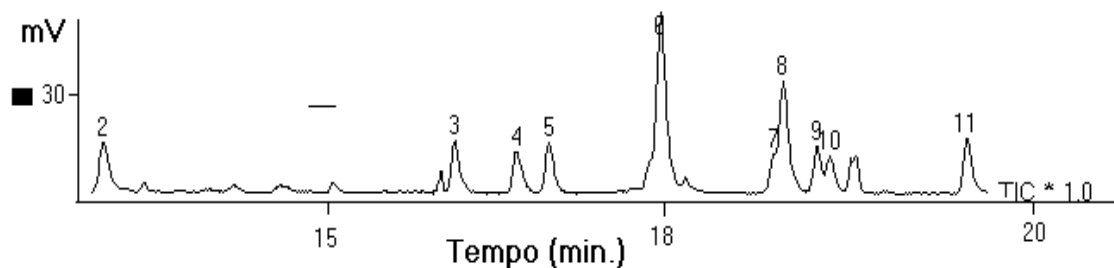


Figura 2 - Ampliação do extrato de glândula de feromônio de *Pseudaletia sequax*, obtido na coluna SP 2340 (30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m).

O espectro de massas (Figura 3) correspondente ao pico 2 (Figura 2) apresenta o pico-base m/z 43 [CH_3CO^+], o que, em conjunto com outros fragmentos característicos e suas intensidades, indica ser um acetato. A perda do ácido acético a partir do íon molecular M^+ (não-detectado) leva ao aparecimento do íon [$\text{C}_{12}\text{H}_{22}$] $^+$ de m/z 166. A molécula de ácido acético, ao ser protonada, gera o íon m/z 61 [$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}_2$] $^+$ de baixa intensidade relativa (10%). Esses íons indicam que o pico 2 é um acetato de hexadecenila linear.

O pico 2 (Figura 2) apresenta tempo de retenção relativo (9,38 min), mais próximo de um acetato dodecenila sintético (Quadro 3) cromatografado sob as mesmas condições.

Comparando o tempo de retenção relativo do pico 2 (Figura 2), com o tempo de retenção relativo dos padrões sintéticos de acetato de dodecenila, dois possíveis isômeros (Quadro 3) são candidatos a serem a substância representada pelo pico 2 (Figura 2), sendo eles os acetatos de: (*Z*)-dodec-7-enila (9,32 min) e (*Z*)-dodec-8-enila (9,43 min), conforme Quadro 3.

Comparações com o tempo de retenção relativo de todos os isômeros do acetato de (*Z*)/dodecenila e (*E*)/dodecenila foram feitas como mostra a Quadro 3.

Quando se compara o espectro de massas do pico 2 (Figura 3) com o espectro de massas do acetato dodecenila sintético (Figura 4), nota-se uma acentuada analogia.

O espectro de massas (Figura 5) correspondente ao pico 3 (Figura 2) apresenta o pico-base m/z 43 [CH_3CO^+], o que, em conjunto com outros fragmentos característicos e suas intensidades, indica ser um acetato. A perda do ácido acético a partir do íon molecular M^+ (não-detectado) leva ao aparecimento do íon [$\text{C}_{14}\text{H}_{26}$] $^+$ de m/z 194. A molécula de ácido acético, ao ser protonada, gera o íon m/z 61 [$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}_2$] $^+$, de baixa intensidade relativa (10%). Esses íons indicam que o pico 3 é um acetato de hexadecenila linear.

O pico 3 (Figura 2) apresenta tempo de retenção relativo (11,83 min), mais próximo de um acetato de tetradecenila sintético (Quadro 4) cromatografado sob as mesmas condições.

Comparando o tempo de retenção relativo do pico 3 (Figura 2) com o tempo de retenção relativo dos padrões sintéticos de acetato de tetradecenila, quatro possíveis isômeros (Quadro 4) são candidatos a serem a substância representada pelo pico 3 (Figura 2), sendo eles os acetatos de: (*E*)-tetradec-2-enila (11,82 min), (*Z*)-tetradec-7-enila (11,82 min), (*Z*)-tetradec-8-enila (11,89 min) e (*E*)-tetradec-11-enila (11,85 min), conforme Quadro 4.

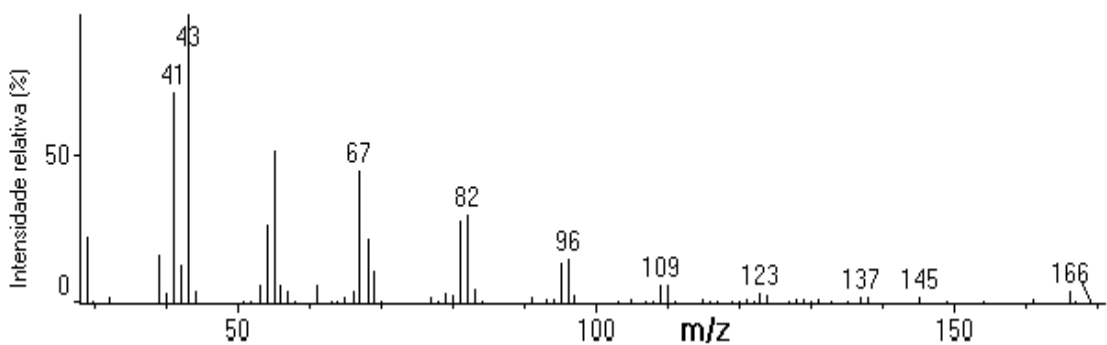


Figura 3 - Espectro de massas do pico 2 (Figura 2).

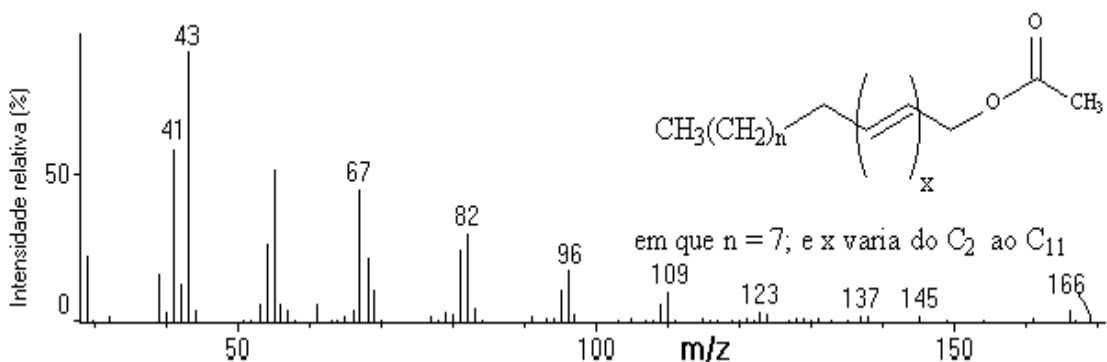


Figura 4 - Espectro de massas de um acetato de dodecenila (padrão).

A comparação com o tempo de retenção relativo de todos os isômeros do acetato de (*Z*)/tetradecenila e (*E*)/tetradecenila foi feita conforme mostrado no Quadro 4.

Quando se compara o espectro de massas do pico 3 (Figura 5) com o espectro de massas do acetato de tetradecenila sintético (Figura 6), nota-se uma acentuada analogia.

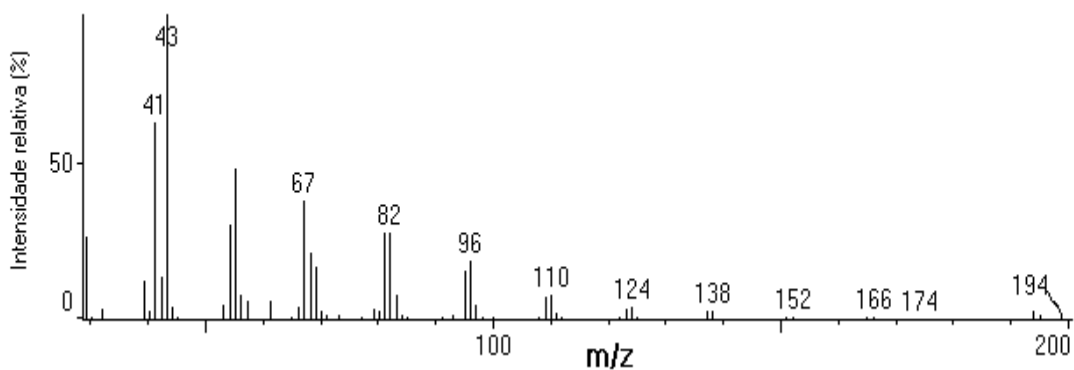


Figura 5 - Espectro de massas do pico 3 (Figura 2).

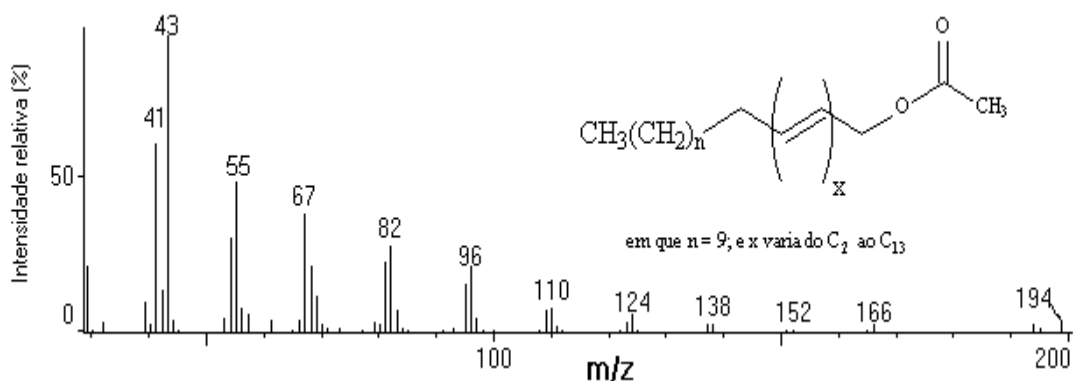


Figura 6 - Espectro de massas de um acetato de tetradecenila (padrão).

Os espectros de massas (Figuras 7, 8 e 9), correspondentes aos picos 8, 9 e 10, respectivamente, apresentam o pico-base m/z 43 [CH_3CO^+], o que, em conjunto com outros fragmentos característicos e suas intensidades, indica ser um acetato. A perda do ácido acético a partir do íon molecular M^+ (não-detectado) leva ao aparecimento do íon [$C_{16}H_{30}$] $^+$ de m/z 222. A molécula de ácido acético, ao ser protonada, gera o íon m/z 61 [$CH_3CO_2H_2$] $^+$, de baixa intensidade relativa (10%). Esses íons indicam que os picos 5, 6 e 7 são acetatos de hexadecenila linear.

Os picos 8, 9 e 10 (Figura 2) apresentam, respectivamente, tempo de retenção relativo igual a 14,12, 14,35 e 14,45 min, mais próximo de um acetato de hexadecenila sintético (Quadro 5) cromatografado sob as mesmas condições.

Comparando o tempo de retenção relativo (rt_r) dos picos 8, 9 e 10 (Figura 2) com o tempo de retenção relativo dos padrões sintéticos (Quadro 5), têm-se as seguintes possibilidades para os compostos desconhecidos, podendo estes ser os isômeros: (*Z*)-6, (*Z*)-7, (*Z*)-8, (*E*)-10, (*E*)-11 e (*E*)-12-AHD, para o pico 8; (*Z*)-10, (*Z*)-11 e (*E*)-13-AHD, para o pico 9; e (*Z*)-11 e (*Z*)-12-AHD, para o pico 10.

Comparações com o tempo de retenção relativo de todos os isômeros do acetato (*Z*)/hexadecenila e (*E*)/hexadecenila foram feitas, como mostra o Quadro 5.

Quando se compara o espectro de massas dos picos 8, 9 e 10 (Figuras 7, 8 e 9) com o espectro de massas do acetato de hexadecenila sintético (Figura 10), nota-se uma acentuada analogia.

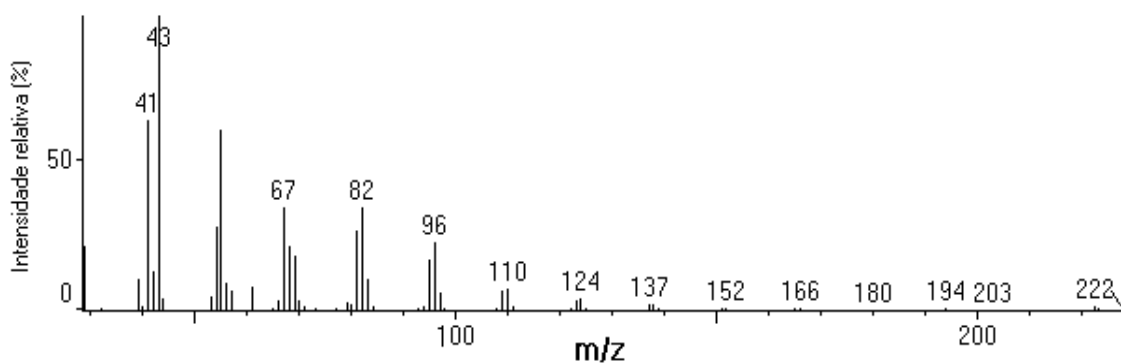


Figura 7 - Espectro de massas do pico 8 (Figura 2).

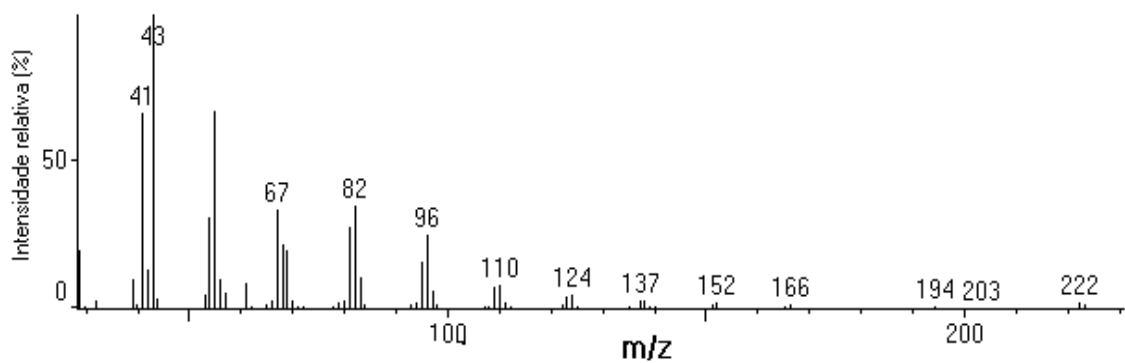


Figura 8 - Espectro de massas do pico 9 (Figura 2).

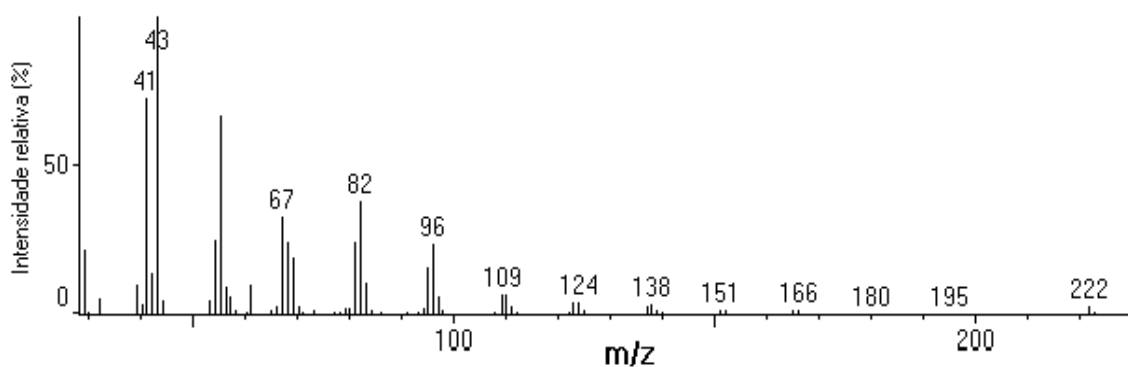


Figura 9 - Espectro de massas do pico 10 (Figura 2).

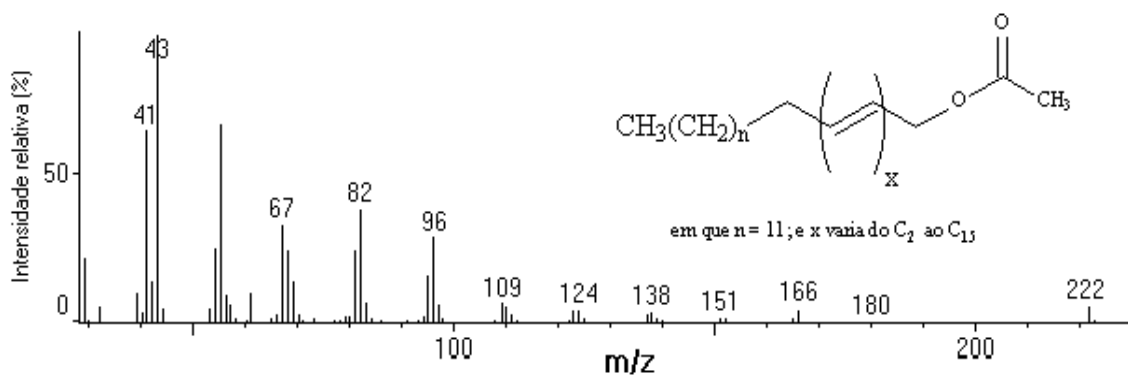


Figura 10 - Espectro de massas de um acetato de hexadecenila (padrão).

3.2.2. Confirmação da posição da dupla ligação dos acetatos presentes nos extratos de *P. sequax*

Foi necessário confirmar a posição exata da dupla ligação em cada composto previamente identificado a partir do tempo de retenção relativo (rt_r). Isso foi efetuado através da derivatização do extrato cru de feromônio de glândulas, com “DMDS” ($\text{CH}_3\text{S-SCH}_3$), e posterior análise em “CG-EM”, sob as condições descritas no Quadro 2, em coluna DB-1, por ser não-polar e com grande resistência a altas temperaturas (aproximadamente 320°C).

A derivatização com “DMDS” é uma forma de reação específica para determinação de dupla ligação, em que há adição de dois radicais do tipo $-\text{SCH}_3$ nos carbonos insaturados.

Nas Figuras 11 e 12, têm-se o cromatograma total de íons e a ampliação do cromatograma, respectivamente, do extrato de feromônio de glândula derivatizado com “DMDS”.

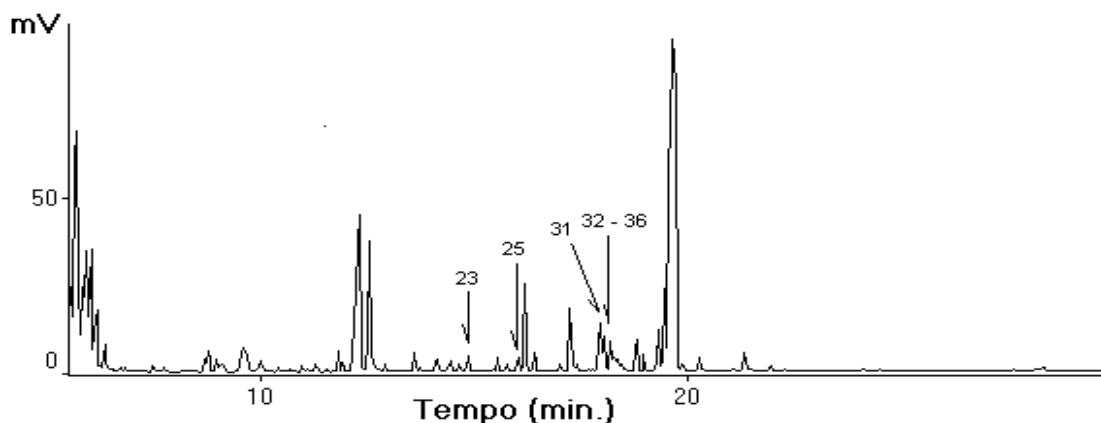


Figura 11 - Cromatograma total de íons (CTI) do derivado de “DMDS” do extrato hexânico de glândula de feromônio de *P. sequax* - DB-1 (30 m x 0,25 mm; 0,25 μm).

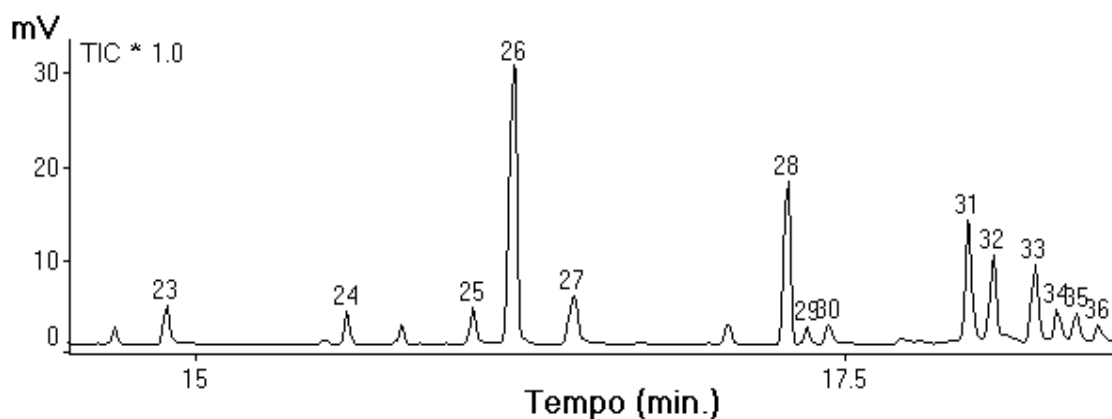


Figura 12 - Ampliação do derivado de “DMDS” do extrato hexânico de glândula de feromônio de *P. sequax* - DB-1 (30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m).

Na Figura 13 está representado o espectro de massas do pico 23 (Figura 12), que apresenta o íon molecular m/z 320 (M^+ , 5%) e fragmentos em m/z 217 ($[\text{CH}_3\text{COOC}_9\text{H}_{18}\text{S}]^+$, 20%), m/z 103 ($[\text{C}_5\text{H}_{11}\text{S}]^+$, 10%), m/z 157 ($[\text{CH}_3\text{COOC}_9\text{H}_{18}\text{S}]^+ - \text{CH}_3\text{COOH}$, 5%), m/z 43 ($[\text{CH}_3\text{CO}]^+$, 100%) e m/z 61 ($[\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}_2]^+$, 52%), o que, em conjunto com outros fragmentos característicos e suas intensidades, indica ser o derivado “DMDS” do acetato de (Z)-dodec-8-enila [(Z)-8-ADD].

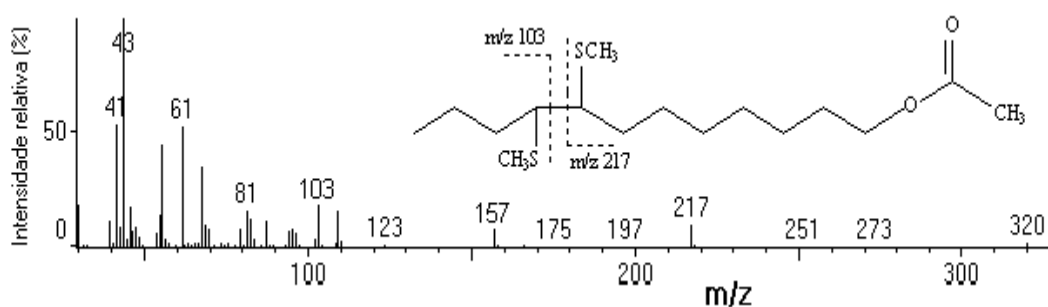


Figura 13 - Espectro de massas do derivado de “DMDS” do pico 23 (Figura 12).

Na Figura 14 está representado o espectro de massas do pico 25 (Figura 12), que apresenta o íon molecular m/z 348 (M^+ , 2,5%) e fragmentos em m/z 217 ($[\text{CH}_3\text{COOC}_9\text{H}_{18}\text{S}]^+$, 8%), m/z 131 ($[\text{C}_7\text{H}_{15}\text{S}]^+$, 15%), m/z 157 ($[\text{CH}_3\text{COOC}_9\text{H}_{18}\text{S}]^+ - \text{CH}_3\text{COOH}$, 5%), m/z 43 ($[\text{CH}_3\text{CO}]^+$, 100%) e m/z 61 ($[\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}_2]^+$, 47%), o que, em conjunto com outros fragmentos característicos e suas intensidades, indica ser o derivado “DMDS” do acetato de (Z)-tetradec-8-enila [(Z)-8-ATD].

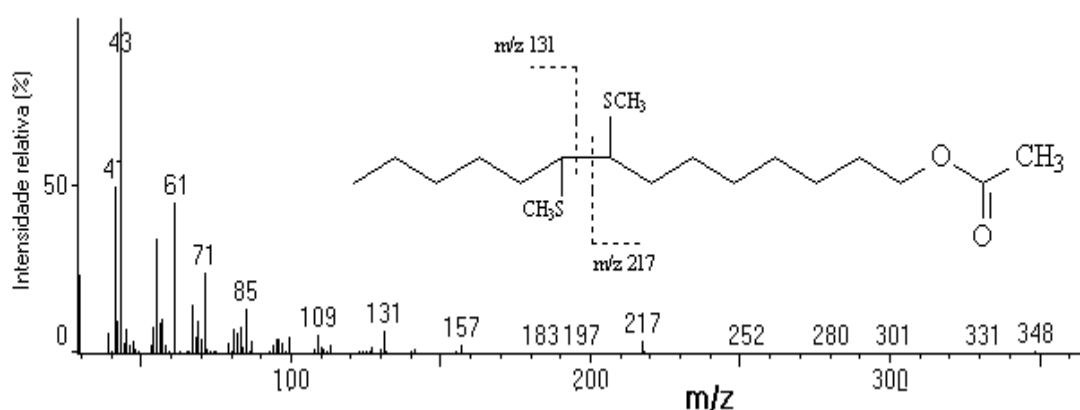


Figura 14 - Espectro de massas do derivado de “DMDS” do pico 25 (Figura 11).

Na Figura 15 está representado o espectro de massas do pico 31 (Figura 12), que apresenta o íon molecular m/z 376 (M^+ , 2,0%) e fragmentos em m/z 217 ($[\text{CH}_3\text{COOC}_9\text{H}_{18}\text{S}]^+$, 10%), m/z 159 ($[\text{C}_9\text{H}_{19}\text{S}]^+$, 12%), m/z 157 ($[\text{CH}_3\text{COOC}_9\text{H}_{18}\text{S}]^+ - \text{CH}_3\text{COOH}$, 2,5%), m/z 43 100% ($[\text{CH}_3\text{CO}]^+$, 100%) e m/z 61 ($[\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}_2]^+$, 55%), o que, em conjunto com outros fragmentos característicos e suas intensidades, indica ser o derivado “DMDS” do acetato de (Z)-hexadec-8-enila [(Z)-8-AHD].

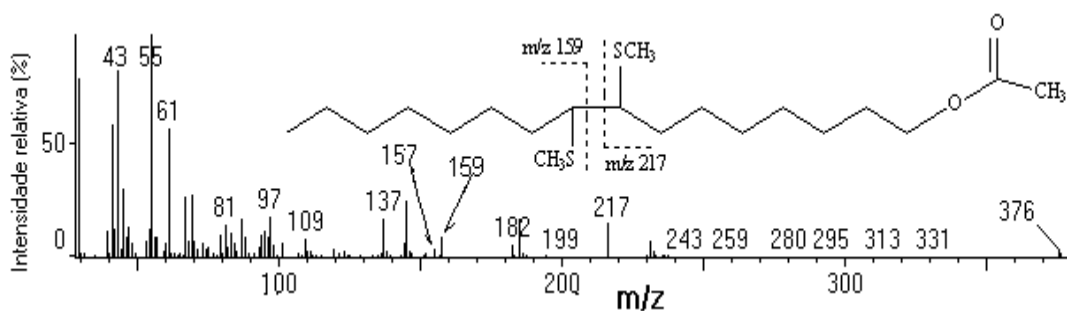


Figura 15 - Espectro de massas do derivado de “DMDS” do pico 31 (Figura 12).

Encontra-se representado na Figura 16 o espectro de massas do pico 33 (Figura 12), que apresenta o íon molecular m/z 376 (M^+ , 2,0%) e fragmentos em m/z 259 ($[CH_3COOC_{12}H_{24}S]^+$, 35%), m/z 117 ($[C_6H_{13}S]^+$, 20%), m/z 199 ($[CH_3COOC_{12}H_{24}S]^+ - CH_3COOH$, 8,0%), m/z 43 ($[CH_3CO]^+$, 100%) e m/z 61 ($[CH_3CO_2H_2]^+$, 48%), o que, em conjunto com outros fragmentos característicos e suas intensidades, indica ser o derivado “DMDS” do acetato de (Z)-hexadec-11-enila [(Z)-11-AHD].

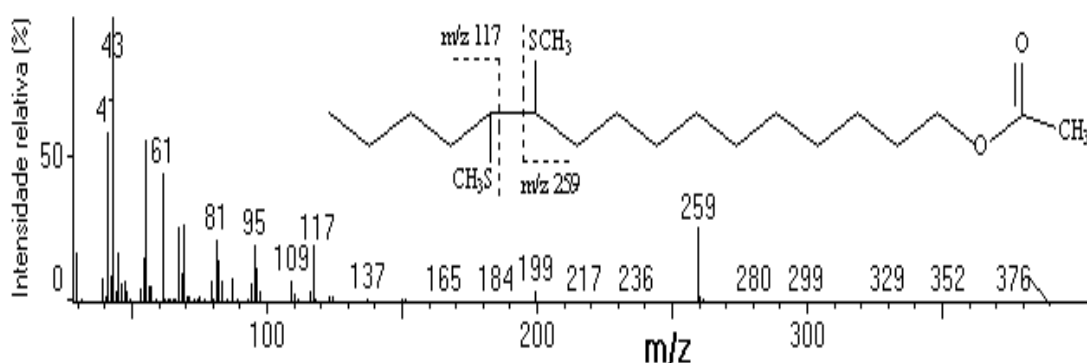


Figura 16 - Espectro de massas do derivado de “DMDS” do pico 33 (Figura 12).

Na Figura 17 está representado o espectro de massas do pico 36 (Figura 12), que apresenta o íon molecular m/z 376 (M^+ , 3,0%) e fragmentos em m/z 273 ($[\text{CH}_3\text{COOC}_{13}\text{H}_{26}\text{S}]^+$, 25%), m/z 103 ($[\text{C}_5\text{H}_{11}\text{S}]^+$, 10%), m/z 213 ($[\text{CH}_3\text{COOC}_{13}\text{H}_{26}\text{S}]^+ - \text{CH}_3\text{COOH}$, 10%), m/z 43 ($[\text{CH}_3\text{CO}]^+$, 100%) e m/z 61 ($[\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}_2]^+$, 47%), o que, em conjunto com outros fragmentos característicos e suas intensidades, indica ser o derivado “DMDS” do acetato de (Z)-hexadec-12-enila [(Z)-12-AHD].

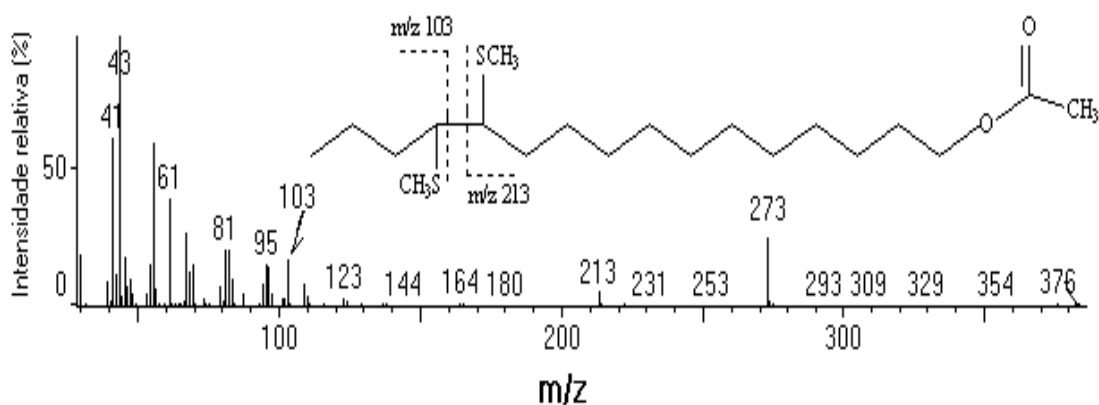


Figura 17 - Espectro de massas do derivado de “DMDS” do pico 36 (Figura 12).

O Quadro 7 representa os tempos de retenção absoluto (t_r) e relativo (rt_r) dos acetatos identificados em extratos de glândulas de feromônio de *P. sequax*, comparados com o tempo de retenção relativo (rt_r) dos padrões de acetatos de dodecenila, tetradecenila, hexadecenila e octadecenila (Quadros 3 a 6), e a confirmação dos compostos através da derivatização com “DMDS”.

Quadro 7 - Identificação de acetatos no extrato hexânico de glândula de feromônio de *Pseudaletia sequax* utilizando dados de tempo de retenção relativo (rt_r), obtidos na coluna capilar SP 2340 e derivados de “DMDS”

Pico n ^o . (Figura 1)	Tempo de retenção (tr) de acetato na glândula de feromônio (min)	Tempo de retenção relativo (rt_r) de acetato na glândula de feromônio (min)	Tempo de retenção relativo (rt_r) do padrão de acetato com uma diferença de $\pm 0,07$ min, como comparado na amostra (min)	Possíveis compostos identificados por comparação de rt_r , dos picos em amostras com os padrões destes, com uma diferença de 0,05min do rt_r e por espectros de massas	Derivados de “DMDS” identificados
2	13,41	9,38	9,32 9,43	(Z)-7-ADD (Z)-8-ADD	(Z)-8-ADD
3	15,83	11,83	11,82 11,82 11,85 11,89	(Z)-7-ATD (E)-2-ATD] (E)-11-ATD or (Z)-8-ATD	(Z)-8-ATD
8	18,16	14,12	14,12 14,12 14,17 14,18 14,19 14,20	(Z)-6-AHD (E)-10-AHD (Z)-7-AHD (E)-11-AHD (E)-12-AHD (Z)-8-AHD	(Z)-8-AHD
9	18,39	14,35	14,34 14,42	(Z)-10-AHD (Z)-11-AHD	(Z)-11-AHD
10	18,49	14,45	14,42 14,52	(Z)-11-AHD (Z)-12-AHD	(Z)-12-AHD

3.3. Utilização do banco de dados para verificar a presença dos acetatos identificados nos extratos brutos de glândulas de *Pseudaletia sequax* e *Elasmopalpus lignosellus*

KOUTEK et al. (1992 e 1997) determinaram as pressões de vapor de vários padrões de acetatos (*Z* e *E*) monoinsaturados, de 12-16 átomos de carbono. MARQUES et al. (2000) determinaram índice de retenção de Kovats para os isômeros dos acetatos de dodecenila, tetradecenila e hexadecenila, em duas colunas capilares de fases estacionárias diferentes (DB-5 e Carbowax). HORIIKE et al. (1981); HORIIKE e HIRANO (1987); LEBEDEVA et al. (1991) utilizaram dados de espectro de massas para determinar posição de dupla ligação em acetatos monoinsaturados. Entretanto, estes estudos não foram aplicados para identificação de compostos em extratos de insetos.

A identificação de compostos por meio de banco de dados de espectro de massas é um método preliminar rápido, utilizado há anos, como, por exemplo, na identificação de drogas, praguicidas, entre outros. No entanto, esse banco não está disponível para identificação de feromônios de lepidópteros e poderia ser útil na identificação preliminar de acetatos monoinsaturados, similares a feromônio de insetos.

A princípio, um banco de dados de espectro de massas seria muito útil na pré-identificação de acetatos monoinsaturados similares a feromônio. Entretanto, devido à semelhança nos espectros de massas desses compostos, a identificação torna-se um tanto limitada.

O banco de dados de espectro de massas (WILLEY), arquivado no sistema Class 5000 do “CG-EM”, não foi utilizado nesses estudos, pelo fato de estar incompleto quanto ao número de isômeros dos acetatos de dodecenila, tetradecenila, hexadecenila e octadecenila.

Os resultados obtidos com a identificação de acetatos monoinsaturados em extratos de *P. sequax* e *E. lignosellus*, através do banco de dados de espectro de massas dos padrões de acetatos monoinsaturados de dodecenila (ADD), tetradecenila (ATD), hexadecenila (AHD) e octadecenila (AOD), estão representados nos Quadros 8 e 9, respectivamente.

Para o extrato de glândula de feromônio de *P. sequax*, o banco de dados de espectro de massas, forneceu as seguintes possibilidades (Quadro 8):

- 1) Pico 2 (Figura 2, item 3.2.1., cap. 2) - diversos isômeros de acetato de tetradecenila e hexadecenila, devido à presença de fragmentos com massa superior à massa do fragmento m/z 166 ($M^+ - 60$), proveniente da perda de uma molécula de ácido acético do íon molecular não-detectado.
- 2) Pico 3 (Figura 2, item 3.2.1., cap. 2) - (Z)-8-ATD, (Z)-9-ATD, (Z)-10-ATD e (E)-3-ATD.
- 3) Pico 8 (Figura 2, item 3.2.1., cap. 2) - (Z)-8-AHD, (Z)-9-AHD, (Z)-10-AHD, (Z)-11-AHD, (Z)-12-AHD, (E)-10-AHD, (E)-11-AHD e (E)-12-AHD.
- 4) Pico 9 (Figura 2, item 3.2.1., cap. 2) - (Z)-9-AHD, (Z)-10-AHD, (Z)-11-AHD, (Z)-12-AHD, (E)-10-AHD, (E)-11-AHD e (E)-12-AHD.
- 5) Pico 10 (Figura 2, item 3.2.1., cap. 2) - (Z)-11-AHD, (Z)-12-AHD, (Z)-13-AHD e (E)-12-AHD.

Para o extrato de glândula de feromônio de *E. lignosellus*, o banco de dados de espectro de massas forneceu as seguintes possibilidades (Quadro 9):

- 1) Pico 5 (Figura 7, item 3.1.3., cap. 1) - (Z)-9-AHD, (Z)-10-AHD, (Z)-11-AHD, (Z)-12-AHD, (Z)-13-AHD, (E)-10-AHD, (E)-11-AHD e (E)-12-AHD.
- 2) Pico 6 (Figura 7, item 3.1.3., cap. 1) - (Z)-9-AHD, (Z)-10-AHD, (Z)-11-AHD, (Z)-12-AHD, (E)-10-AHD, (E)-11-AHD e (E)-12-AHD.
- 3) Pico 7 (Figura 7, item 3.1.3., cap. 1) - (Z)-9-AHD, (Z)-10-AHD, (Z)-11-AHD, (Z)-12-AHD, (E)-10-AHD, (E)-11-AHD e (E)-12-AHD e (E)-13-AHD.

Observando os Quadros 8 e 9, pode-se notar que os dados obtidos pelo banco de dados de espectro de massas, dos compostos desconhecidos, presentes em extratos de glândulas de feromônio de *P. sequax* e *E. lignosellus*, respectivamente, não foram totalmente compatíveis com os resultados obtidos através da comparação com o tempo de retenção relativo (rt_r) entre os compostos desconhecidos e os padrões de acetatos e seus respectivos espectros de massas. Entretanto, em cada caso, o isômero correto foi identificado.

A falta de melhor identificação se deveu à limitação do software disponível no sistema do “CG-EM”. Por exemplo, o sistema não permitiu incorporar o tempo de retenção dos padrões, juntamente com a identificação com o banco de dados. Também não foi possível escolher as faixas desejadas dos espectros de massas dos picos presentes nos extratos de glândula, para comparação com o banco de dados. A inclusão desses dois parâmetros citados poderia levar a uma melhor identificação com relação ao que foi realizado neste trabalho.

Apesar das limitações, os resultados obtidos dos compostos desconhecidos quanto ao banco de dados é muito útil na identificação de compostos similares a feromônio da ordem Lepidoptera, representando melhoria significativa na identificação de acetatos utilizando razões de m/z (HORIIKE et al., 1981; LANNE et al., 1985; HORIIKE e HIRANO, 1987; LEBEDEVA et al., 1991).

Quadro 8 - Identificação de acetatos no extrato hexânico de glândula de feromônio de *Pseudaletia sequax*, utilizando banco de dados de acetatos (Z e E) de dodecenila (ADD), tetradecenila (ATD), hexadecenila (AHD) e octadecenila (AOD)

Pico n°. (Figura 2 - cap. 2)	Possíveis compostos identificados por "CG-EM"	Derivados de "DMDS" identificados	Possíveis compostos identificados pelo banco de dados (SI > 90%)
2	(Z)-7-ADD e (Z)-8-ADD	(Z)-8-ADD	Diversos isômeros de acetatos de tetradecenila (ATD) e hexadecenila (AHD)
3	(Z)-7-ATD; (E)-2-ATD (E)-11-ATD; (Z)-8-ATD	(Z)-8-ATD	(Z)-8-ATD; (Z)-9-ATD; (Z)-10-ATD; (E)-3-ATD
8	(Z)-6-AHD; (E)-10-AHD (Z)-7-AHD; (E)-11-AHD (E)-12-AHD; (Z)-8-AHD	(Z)-8-AHD	(Z)-8-AHD; (Z)-9-AHD; (Z)-10-AHD; (Z)-11-AHD; (Z)-12-AHD; (E)-10-AHD; (E)-11-AHD; (E)-12-AHD
9	(Z)-10-AHD e (Z)-11-AHD	(Z)-11-AHD	(Z)-9-AHD; (Z)-10-AHD; (Z)-11-AHD; (Z)-12-AHD; (E)-10-AHD; (E)-11-AHD; (E)-12-AHD
10	(Z)-11-AHD e (Z)-12-AHD	(Z)-12-AHD	(Z)-11-AHD; (Z)-12-AHD; (Z)-13-AHD; (E)-12-AHD

Quadro 9 - Identificação de acetatos no extrato hexânico de glândula de feromônio de *Elasmopalpus lignosellus*, utilizando banco de dados de acetatos (Z e E) de dodecenila (ADD), tetradecenila (ATD), hexadecenila (AHD) e octadecenila (AOD)

Pico n°. (Figura 7 - cap. 1)	Possíveis compostos identificados por "CG-EM"	Derivados de "DMDS" identificados	Possíveis compostos identificados pelo banco de dados (SI > 90%)
5	(E)-8-AHD e (E)-9-AHD	ND ^(*)	(Z)-9-AHD; (Z)-10-AHD; (Z)-11-AHD; (Z)-12-AHD; (Z)-13-AHD; (E)-10-AHD; (E)-11-AHD; (E)-12-AHD
6	(Z)-9-AHD, (Z)-10-AHD e (E)-13-AHD	(Z)-9-AHD	(Z)-9-AHD; (Z)-10-AHD; (Z)-11-AHD; (Z)-12-AHD; (E)-10-AHD; (E)-11-AHD; (E)-12-AHD
7	(Z)-11-AHD	(Z)-11-AHD	(Z)-9-AHD; (Z)-10-AHD; (Z)-11-AHD; (Z)-12-AHD; (E)-10-AHD; (E)-11-AHD; (E)-12-AHD

(*) Não-detectado.

4. RESUMO E CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi estudada a utilidade do tempo de retenção relativo (rt_r) em três colunas, espectro de massas e um banco de dados de espectro de massas da maioria dos padrões sintéticos de acetatos de dodecenila, tetradecenila, hexadecenila e octadecenila, na identificação destes, em extratos de glândulas de feromônio de *E. lignosellus* e *P. sequax*.

Dados de tempo de retenção relativo (rt_r), obtidos em coluna capilar SP 2340 (altamente polar) e espectro de massas, foram extremamente úteis para identificação dos acetatos presentes em extrato de glândula de *P. sequax* e *E. lignosellus*, pois foi possível reduzir significativamente o número de isômeros de acetatos de dodecenila, tetradecenila e hexadecenila. Entretanto, a identificação final dos acetatos presentes nos extratos, só foi possível através da formação de derivados de “DMDS”.

A identificação dos acetatos presentes em extratos de glândulas de *P. sequax* e de *E. lignosellus*, obtidos a partir do banco de dados, foi relatada pela primeira vez na literatura. Este método mostrou ser relativamente eficaz, sendo um avanço significativo sobre os métodos descritos na literatura, porém, inferior ao método de identificação por tempo de retenção relativo e “DMDS”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDO, T., INOMATA, S., SHIMADA, R., MOMURA, M., UEHARA, S., PU, G. Sex pheromones of *Thysanoplusia interinixta* and *T. orichakea*: Identification and field test. **J. Chem. Ecol.**, 24, 1105-1116, 1998.
- ATTYGALLE, A. B., MORGAN, E. D. Pheromones in Nanogram Quantities: Structure Determination by Combined Microchemical and Gas Chromatographic Methods. **Angew. Chem. Int. Ed. Ed.**, 27, 470-478, 1988.
- ATTYGALLE, A. B., JHAM, G. N., SVATOS, A., FRIGHETTO, R. T., MEINWALD, J., VILELA, E. F., FERRARA, F. A. Microscale, Random Reduction: Application to the characterization of (3E,8Z,11Z)-3,8,11-tetradecatrienyl acetate - a new lepidopteran sex pheromone. **Tetrah. Lett.**, 36, 5471-5474, 1995.
- ATTYGALLE, A. B., JHAM, G. N., SVATOS, A.; FRIGHETO, R., VILELA, E. F., MEINWALD, J. Identification of major component of sex pheromone of *Scrobipalpuloides absoluta*. **Bio. Med. Chem.**, 4, 305-314, 1996a.
- ATTYGALLE, A. B., JHAM, G. N., SVATOS, A., FRIGHETTO, R. T. S., MEINWALD, J., VILELA, E., FERRARA, F. A.. (3E,8Z,11Z) - 3,8,11 - Tetradecatrienyl acetate: a major component of sex pheromone of tomato pest *Scrobipalpuloides absoluta*. **Bio. Med. Chem.**, 4: 305- 314, 1996b.

- BELL, T. W., MEINWALD, J. Pheromones of two arctiid moths *Cretonotos transiens* and *C. gangis*: Chiral components from both sexes and achiral female components. **J. Chem. Ecol.**, 12, 385-409, 1986.
- BENNETT, F. D. Outbreaks of *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Phycitidae) to sugar-cane in Jamaica, Barbados and St. Kitts. **Trop. Agric.** 39(2), 153-156, 1962.
- BERTELS, A. Estudos da influência da umidade sobre a dinâmica das populações de lepidópteras pragas de milho. **Pesq. Agrop. Bras.**, 5, 67-68, 1970.
- BJOSTAD, L. B. Insect eletroantennogram responses to semiochemicals recorded with an inexpensive personal computer. **Physiol. Ent.**, 13, 139 - 145, 1998.
- BUSER, H-R., ARN, H., GUERIN, P., RAUSCHER, S. Determination of double bond position in mono-unsaturated acetates by mass spectrometry of dimethyl disulfide adducts. **Anal. Chem.**, 55, 818-822, 1983.
- BYERS, J. R., HERLE, C. E. Identification of sex pheromones of *Leucania Anteocia* S. and *Leucania commoides* G. N. (Lepidoptera: Noctuidae: Hadeninae). **J. of Chem. Ecol.**, 23, 473-485, 1997.
- CHALFANT, R. B. A simplified technique for rearing the lesser cornstalk borer. **J. Ga. Ent. Soc.**, 10(1), 33-37, 1975.
- CHRISTENSEN, T. A., GEOFRION, S. C., HILDEBRAND, J. G. Physiology of interspecific chemical communication in *Heliothis* moths. **Physiol. Entomol.**, 15, 275-283, 1990.
- DHAWAN, A. K., SIDHU, A. S. Use of gossypure for the control of pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) in Punjab. **Pesticides (India)**, 23(12), 33-35, 1989.
- DOOLITTLE, R. E., TUMLINSON, J. H., PROVEAUX, A. Determination of double bond position in conjugated dienes by chemical ionization mass spectrometry with isobutane. **Anal. Chem.**, 57, 1625-1630, 1985.

- FERRÃO, P., GRIES, G., MIMALARANTE, P. G., MAIER, C. T., GRIES, R., SLEESOR, K., LI, J. Sex pheromone of apple blotch leaf miner, *Phyllonorycter crataegella* and its effect on *P. mespilella* pheromone communication. **Journal of Chemical Ecology**, 24, 2059-2078, 1998.
- FERRARA, F., VILELA, E., JHAM, G. N., EIRAS, A., PICANÇO, M., ATTYGALLE, A. B., SVATOS, A., FRIGHETTO, R. Evaluation of the synthetic major component of sex pheromone of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **J. of Chem. Ecol.**, 2001 (no prelo)
- FRÉROT, B., LUCAS, P., ROCHAT, D. Responses of *Mamestra suasa* male moths to synthetic pheromone compounds in a wind tunnel. **Entomol. Exp. Appl.**, 53, 81-87, 1989.
- GRIEPINK, F. C., VAN BEEK, T. A., POSTHUMUS, M. A., DE GROOT, A. Identification of the Sex Pheromone of *Scrobipalpula absoluta*; Determination of double bond positions in triple unsaturated straight chain molecules by means of dimethyl disulphide derivatization. **Tetrah. Lett.**, 37, 3, 411-414, 1996.
- GUERRERO, A., CAMPS, F., COLL, J., RIBA, M., EINHORN, J., WILLIAMS, J. R. Identification of a potential sex pheromone of the processionary moth *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera: Notodontidae). **Tetrah. Lett.**, 22(21), 2013-2016, 1981.
- HEATH, R. R., BURNSED, G. E., TUMLINSON, J. H., DOOLITTLE, R. E. Separation of a series of positional and geometrical isomers of olefinic aliphatic primary alcohols and acetates by capillary gas chromatography. **J. of Chromat.**, 189, 199-208, 1980.
- HEATH, R. R., MITCHELL, E. R., TOVAR, J. C. Effect of release rate and ratio of (Z)-11-hexadecen-1-ol from synthetic pheromone blends on trap capture of *Heliothis subflexa* (Lepidoptera: Noctuidae). **J. of Chem. Ecol.**, 16(4), 1259-1268, 1990.
- HILL, A. S., RINGS, R. W., SWIER, S. R., ROELOFS, W. L. Sex pheromone of the black cutworm moth, *Agrotis ipsilon*. **J. of Chem. Ecol.**, 5(3), 439-457, 1979.

- HO, H. Y., TAO, Y. T., TSAI, R. S., WU, Y. L., TSENG, H. K., CHOW, Y. S. Isolation, identification and synthesis of sex pheromone components of female tea cluster caterpillar, *Andraca bipunctata* (Walker) (Lepidoptera: Bombycidae) in Taiwan. **J. of Chem. Ecol.**, 22(2), 271-285, 1996.
- HOLLOWAY, R. L., SMITH JUNIOR, J. W. Locomotor activity of adult lesser cornstalk borer. **Ann. Ent. Soc. Am.**, 68, 885-887, 1975.
- HORAK, M., WHITTLE, C. P., BELLAS, T. E., RUMBO, E. R. Pheromone gland components of some Australian tortricids in relation to their taxonomy. **J. Chem. Ecol.** 14, 1163-1175, 1988.
- HORIIKE, M., MYIATA, N., HIRANO, C. An empirical approach to the location of double bonds in tetradecen-1-yl acetates by mass spectrometry. **Biom. Mass Spect.**, 8(1), 41-42, 1981.
- HORIIKE, M., OOMAE, S., HIRANO, C. Determination of the double bond positions in three dodecenol (Z) isomers by electron impact mass spectrometry. **Biom. and Environ. Mass Spect.**, 13, 117-120, 1986.
- HORIIKE, M., HIRANO, C. Location of double bonds in tetradecenyl acetates by electron impact mass spectrometry. **Biom. and Environ. Mass Spect.**, 14, 183-185, 1987.
- HUMMEL, H. E., GASTON, L. K., SHOREY, H. H., KAAE, R. S., BYRNE, K. S., SILVERSTEIN, R. M. Clarification of the chemical status of the pink bollworm pheromone. **Science**, 181: 893-895, 1973.
- ISELY, D., MINER, F. D. The lesser cornstalk borer, a pest of fava beans. **J. Kansas Entomol. Soc.**, 17, 51-57, 1944.
- KOUTEK, B., HOSKOVEC, M., KONECNY, K., VRKOC, J. Gas chromatographic determination of vapour pressures of pheromone-like acetates. **J. of Chromat.**, 626, 215-221, 1992.
- KOUTEK, B., HOSKOVEC, M., VRKOCOVA, P., KONECNY, K., FELTL, L., VRKOC, J. Gas chromatographic determination of vapour pressures of pheromone-like compounds. III. Aldehydes. **J. of Chromat.**, 719, 391-400, 1996.

- KOUTEK, B., HOSKOVEC, M., VRKOCOVÁ, P., FELTL, L. Gas chromatographic determination of vapour pressures of pheromone-like compounds. IV. Acetates, a reinvestigation. **J. of Chromat.**, 759, 93-109, 1997.
- KOUTEK, B., HOSKOVEC, M., STREINZ, L., VRKOCOVÁ, P., RUZICKA, K. Additivity of vaporization properties in pheromone-like homologous series. **J. Chem. Soc., Perkin Trans.**, 2, 1351-1356, 1998.
- LANNE, B. S., APPELGREN, M. BERGSTRÖM, G. Determination of the double bond position in monounsaturated acetates from their mass spectra. **Anal. Chem.**, 57, 8, 1621-1625, 1985.
- LEAL, W. S., KUWAHARA, S., SHI, X., HIGUCHI, H., MARINO, C. E. B., ONO, M., MEINWALD, J. Male-released sex pheromone of the stink bug *Piezodorus hybneri*. **J. of Chem. Ecol.**, 24: 1817-1829, 1998.
- LEBEDEVA, K. V., VENDILO, N. V., BOCHAROVA, N. I., VASIL'EVA, V. S., ZAVISION, S. Y. Determination of the position of a double bond from characteristics of the mass spectrum of a unsaturated compound. Communication 1. Determination of the position of a double bond in a monounsaturated acetates that are components of the pheromones of Lepidoptera. **Agrokhimiya**, 10, 122-166, 1991.
- LEONHARDT, B. A., DeVILBISS, E. D. Separation and double-bond determination on nanogram quantities of aliphatic monounsaturated alcohols, aldehydes and carboxylic acid methyl esters. **J. of Chromat.**, 322, 484-490, 1985.
- LYNCH, R. E., KLUN, J. A., LEONHARDT, B. A., SCHWARL, M., GARNER, J. W., Female sex pheromone of the lesser cornstalk borer, *Elasmopalpus lignosellus*. **Environ. Entomol.**, 13, 121-126, 1984.
- MAGRI, D. C. **Efeito de fumaça e de cinzas na biologia reprodutiva de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae)**. Viçosa-MG, UFV, 1999. 56p. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- MARQUES, F. A., McELFRESH, J. S., MILLAR, J. G. Kovats retention indexes of monounsaturated C₁₂, C₁₄ and C₁₆ alcohols, acetates and aldehydes commonly found in lepidopteran pheromone blends. **J. Braz. Chem. Soc.**, 11: 592-599, 2000.

- PAKER, S. P. Synopsis and Classification of Living Organisms. New York, McGraw-Hill, vol. 2, 1232p, 1982.
- PAYNE, T. L. , SMITH, J. H. A sex pheromone in the lesser cornstalk borer. **Eviron. Entomol.** 4, 355-356, 1975.
- PEPE, C., SAYER, H., DAGAUT, J., COUFFIGNAL, R.. Determination of double bond position in triunsaturated compounds by means of gas chromatography/mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives. **Rapid Comm. in Mass Spect.**, 11, 919-921, 1997.
- PIMENTEL, D. **Handbook of natural pesticides**, vol. 1 (Ed. Mandava, B. N.), CRC press, pp. 3-19, 1985.
- PIRES, C. S. S., VILELA, E. F., VIANA, P. A., FERREIRA, J. T. B. Avaliação no campo do feromônio sexual sintético de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae). **An. Soc. Ent. Bras.**, 21, 413-417, 1992.
- PIRES, C. S. S., VILELA, E., VIANA, P. A. Comportamento de fêmeas de *Elasmopalpus lignosellus* associado a liberação de feromônio sexual. **Ann. Soc. Ent. Bras.**, 23: 1-12, 1994.
- SALVADORI, J. R., SILVA, J. J. C., GOMES, S. A. Pragas do trigo no estado de Mato Grosso do Sul. Dourados, **EMBRAPA-UEPAE Dourados, Circular técnica**, 9, 46p, 1983.
- SALVADORI, J. R., PARRA, R. P. Desempenho de *Pseudaletia sequax* (Lepidoptera: Noctuidae) em dietas natural e artificial. **Pesq. Agropec. Bras.**, 25(12),1679-1686, 1990a.
- SALVADORI, J. R., PARRA, R. P. Efeito da temperatura na biologia e exigências térmicas de *Pseudaletia sequax* (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta artificial. **Pesq. Agropec. Bras.**, 25(12), 1693-1700, 1990b.
- SALVADORI, J. R., PARRA, R. P. Seleção de dietas artificiais para *Pseudaletia sequax* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesq. Agropec. Bras.**, 25 (12): 1701-1713, 1990c.

- SALVADORI, J. R. Biologia, nutrição e exigências térmicas de *Pseudaletia sequax* (Flanclemont, 1951) (Lepidóptera: Noctuidae) em dieta artificial. **Dissertação de doutorado**, 121p.
- SARMIENTO, S., CISNEROS, F., VEIGA, G., HERNADEZ, K., GIANELLA, D., GARRIDO, R.. Control químico del perforador de plantas tiernas de maiz *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller). **An. Cient.**, 11, 36-54, 1973.
- SCHAAF, A. C.. A Survey of the damage caused by *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Phycitinae) to sugarcane in Jamaica. **A. C. Proc. Cong. Int. Sugar Cane Technol.**, 15, 488-497, 1973.
- SPIEKSMAN, W., LUIJK, R. , GOVERS, A. J. Determination of the liquid vapour pressure of low-volatility compounds from the Kováts retention index. **J. of Chromat. A**, 672: 141-148, 1994.
- SVATOS, A., ATTYGALLE, A. B., JHAM, G. N., FRIGHETTO, R. T. S., SAMAN, D., MEINWALD, J. , VILLELA, E.. Sex pheromone of tomato pest *Scrobipalpus absoluta*. **J. of Chem. Ecol.**, 22: 787-800, 1996.
- TEAL, P. E. A., MITCHELL, E. R., TUMLINSON, J. H. HEATH, R. R. , SUGIE, H. Identification of volatile sex pheromone components released by the southern armyworm, *Spodoptera eridania* (Cramer). **J. of Chem. Ecol.**, 11 (6): 717-725, 1985.
- TEIXEIRA, A. L. Identificação do feromônio sexual de *Spodoptera latifascia* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). Universidade Federal de Viçosa, 1991. (**Dissertação de Mestrado**), 83p.
- TUMLINSON, J. H., MITCHELL, E. R., TEAL, P. E. A., HEATH, R. R., MENGELKOCH, L. J. Sex pheromone of fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. Identification of components critical to attraction in the field. **J. Chem. Ecol.**, 12, 1909-1926, 1986.
- VIANA, P. A., Effect of soil moisture substrate color and smoke on the population dynamics and behavior of the lesser cornstalk borer, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae). West Lafayette: Purdue University, 1981. **Dissertação (Mestrado)**.

VIANA, P. A.. Importância Econômica e Bioecologia da Broca *Elasmopalpus lignosellus*. **Conferência 2^o Simpósio Latino-americano de Cana-de-açúcar**, 1993.

VILELA, E. F., DELLA LUCIA, T. M. C. **Feromônios de Insetos**. 155p, 1987.

VINCENTI, M., GUGLIELMETTI, G., CASSANI, G., TONINI, C. Determination of double bond position in diunsaturated compounds by mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives. **Anal. Chem.**, 59, 694-699, 1987.

APÊNDICE

APÊNDICE

Quadro 1A - Tempo de retenção dos padrões de acetato de (E) hexadecenila (AHD), obtidos na coluna capilar de sílica fundida DB-1 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m)

Composto	Tempo de retenção
E-2-AHD	Não-disponível
E-3-AHD	25.478
E-4-AHD	25.529
E-5-AHD	25.480
E-6-AHD	25.482
E-7-AHD	25.479
E-8-AHD	25.485
E-9-AHD	25.532
E-10-AHD	25.559
E-11-AHD	25.614
E-12-AHD	25.660
E-13-AHD	25.807
E-14-AHD	Não-disponível
E-15-AHD	Não-disponível

Quadro 2 - Tempo de retenção dos padrões de acetato de (Z) hexadecenila (AHD), obtidos na coluna capilar de sílica fundida DB-1 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m)

Composto	Tempo de retenção
Z-2-AHD	Não-disponível
Z-3-AHD	25,477
Z-4-AHD	25,378
Z-5-AHD	25,409
Z-6-AHD	25,360
Z-7-AHD	25,390
Z-8-AHD	25,403
Z-9-AHD	25,430
Z-10-AHD	25,529
Z-11-AHD	25,629
Z-12-AHD	25,732
Z-13-AHD	25,816
Z-14-AHD	Não-disponível
Z-15-AHD	Não-disponível

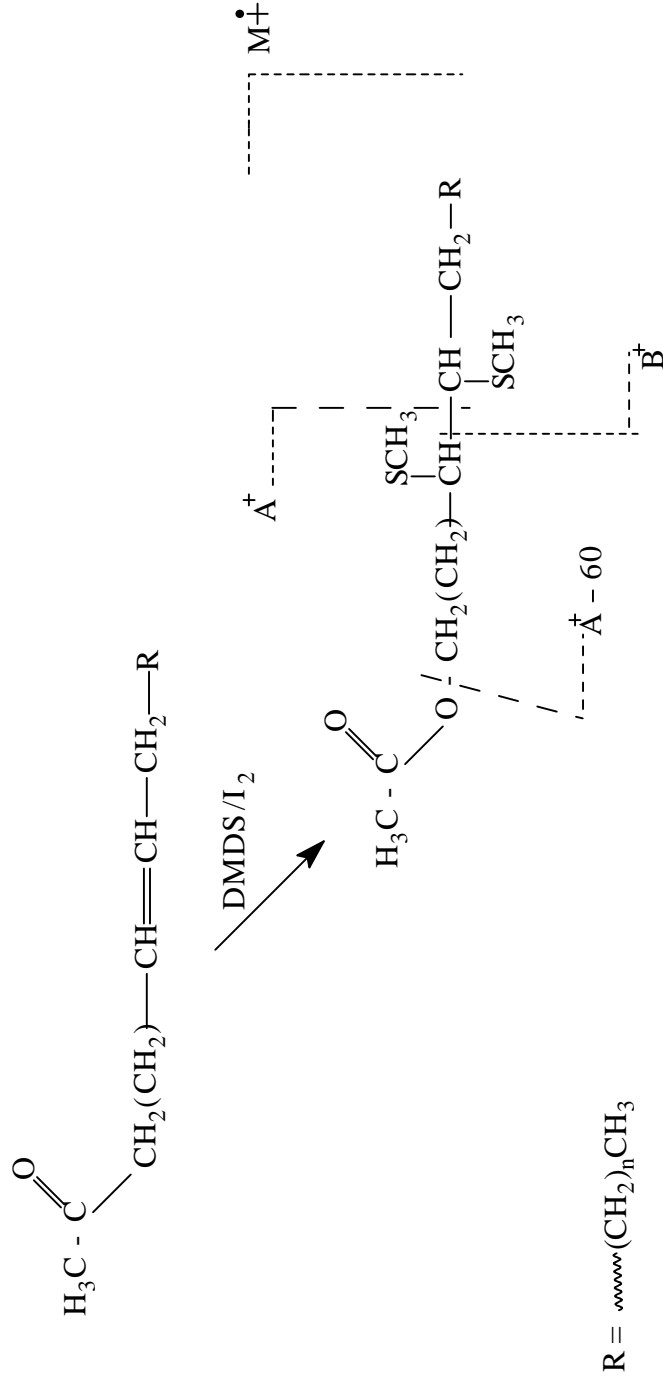


Figura 1A - Demonstração geral da formação de derivados "DMDS" em acetatos monoinsaturados, através da adição de "DMDS" à dupla ligação carbono-carbono.

Quadro 3A - Valores de espectrometria de massas por impacto de elétrons, dos fragmentos que caracterizam a posição da dupla ligação, em isômeros de acetato de (Z e E) dodecenila (ADD), derivatizado com “DMDS”

Posição da dupla ligação do acetato derivatizado com “DMDS”	Íon molecular (M ⁺)	Principais fragmentos que caracterizam a posição da dupla ligação		
		A ⁺	B ⁺	A ⁺ - 60
2	320	133	187	73
3		147	173	87
4		161	159	101
5		175	145	115
6		189	131	129
7		203	117	143
8		217	103	157
9		231	89	171
10		245	75	185
Δ11		259	61	199

Quadro 4A - Valores de espectrometria de massas por impacto de elétrons, dos fragmentos que caracterizam a posição da dupla ligação, em isômeros de acetato de (Z e E) tetradecenila (ATD), derivatizado com “DMDS”

Posição da dupla ligação do acetato derivatizado com “DMDS”	Íon molecular (M ⁺)	Principais fragmentos que caracterizam a posição da dupla ligação		
		A ⁺	B ⁺	A ⁺ - 60
2	348	133	215	73
3		147	201	87
4		161	187	101
5		175	173	115
6		189	159	129
7		203	145	143
8		217	131	157
9		231	117	171
10		245	103	185
11		259	89	199
12		273	75	213
Δ13		287	61	227

Quadro 5A - Valores de espectrometria de massas por impacto de elétrons, dos fragmentos que caracterizam a posição da dupla ligação, em isômeros de acetato de (Z e E) hexadecenila (AHD), derivatizado com “DMDS”

Posição da dupla ligação do acetato derivatizado com “DMDS”	Íon molecular (M ⁺)	Principais fragmentos que caracterizam a posição da dupla ligação		
		A ⁺	B ⁺	A ⁺ - 60
2	376	133	243	73
3		147	229	87
4		161	215	101
5		175	201	115
6		189	187	129
7		203	173	143
8		217	159	157
9		231	145	171
10		245	131	185
11		259	117	199
12		273	103	213
13		287	89	227
14		301	75	241
Δ15		315	61	255

Quadro 6A - Valores de espectrometria de massas por impacto de elétrons, dos fragmentos que caracterizam a posição da dupla ligação, em isômeros de acetato de (Z e E) hexadecenila (AHD), derivatizado com “DMDS”

Posição da dupla ligação do acetato derivatizado com “DMDS”	Íon molecular (M ⁺)	Principais fragmentos que caracterizam a posição da dupla ligação		
		A ⁺	B ⁺	A ⁺ - 60
2	404	133	271	73
3		147	257	87
4		161	243	101
5		175	229	115
6		189	215	129
7		203	201	143
8		217	187	157
9		231	173	171
10		245	159	185
11		259	145	199
12		273	131	213
13		287	117	227
14		301	103	241
15		315	89	255
16		329	75	269
Δ17		343	61	283