



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

GEANNE KARLA NOVAIS SANTOS

**SEMIOQUÍMICOS E PERFIL DE HIDROCARBONETOS CUTICULARES EM  
ESPÉCIES DE BESOUROS ANTÓFILOS DA TRIBO CYCLOCEPHALINI  
(COLEOPTERA; MELOLONTHIDAE; DINASTINAE)**

Recife

2017

Geanne Karla Novais Santos

Semioquímicos e perfil de hidrocarbonetos cuticulares em espécies de besouros antófilos da tribo Cyclocephalini (Coleoptera; Melolonthidae; Dinastinae)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro

Co-orientador: Dr Artur Campos Dália Maia

Recife

2017

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Elaine Cristina de Freitas CRB4-1790

S237s Santos, Geanne Karla Novais  
Semioquímicos e perfil de hidrocarbonetos cuticulares em espécies de besouros antófilos da tribo Cyclocephalini (Coleoptera; Melolonthidae; Dinastinae) / Geanne Karla Novais Santos. – 2017.  
111 f.: fig.,tab.

Orientadora: Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental. Recife, 2017.  
Inclui referências

1. Ecologia Química 2. Cyclocephala 3. Cantarofilia 4. Eletrofisiologia I. Navarro, Daniela Maria do Amaral Ferraz (Orientadora) II. Título.

577.14 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2018-25

**GEANNE KARLA NOVAIS SANTOS**

***SEMIOQUÍMICOS E PERFIL DE HIDROCARBONETOS CUTICULARES EM  
ESPÉCIES DE BESOUROS ANTÓFILOS DA TRIBO CYCLOCEPHALINI  
(COLEOPTERA; MELOLONTHIDAE; DINASTINAE)***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovado em: 24/01/2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>ª</sup> Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro**  
Departamento de Química Fundamental  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Prof<sup>º</sup> Paulo Millet-Pinheiro**  
Departamento de Botânica  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Prof<sup>º</sup> Dr. Wendel José Teles Pontes**  
Departamento de Zoologia  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Prof<sup>ª</sup> Jarcilene Silva Almeida Cortez**  
Departamento de Botânica  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Prof<sup>ª</sup> Ruth Rufino do Nascimento**  
Instituto de Química e Biotecnologia  
Universidade Federal de Alagoas

a Diego e a minha família

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aqui a todos que me ajudaram na elaboração deste trabalho:

Primeiramente à minha orientadora prof<sup>a</sup> Daniela Navarro, a quem devo minha formação como pesquisadora

Ao meu co-orientador Artur Maia, que teve a ideia deste trabalho e me apresentou ao mundo da ecologia química de Cyclocephalini

A todos os colegas do Laboratório de Ecologia Química pela ajuda direta ou indireta e pelos momentos de descontração

A Marcelo Felipe, companheiro de coletas de campo e colega nos estudos de ecologia química

A Paulo Milet-Pinheiro que me ensinou a técnica de EAD.

Ao prof. Paschoal Grossi pela identificação das espécies de besouro

A Patrícia da Silva Santa Rosa, da Secretaria de Pós-Graduação, que me salvou em momentos de esquecimento

A CAPES pela bolsa concedida

## RESUMO

Neste trabalho foram estudados aspectos da ecologia química de espécies de besouros da tribo Cyclocephalini (Melolonthidae; Dynastinae), relacionados à sua biologia reprodutiva. Extratos epicuticulares obtidos a partir de imersão de exemplares de *Cyclocephala cearae*, *C. celata* e *Erioscelis emarginata* em 1 mL de hexano por 1 min foram analisados em CG-EM para que se caracterizassem os perfis de hidrocarbonetos cuticulares de cada uma das três espécies. Em todos os perfis verificou-se predomínio de hidrocarbonetos alifáticos com número ímpar de carbonos, principalmente alcanos e alcenos monoinsaturados. As composições desses hidrocarbonetos diferiu entre as três espécies estudadas, com predomínio de dois alcenos monoinsaturados com 25 átomos de carbono em *C. cearae*; um alceno monoinsaturado com 23 átomos de carbono em *C. celata*; e um alcano (*n*-heptacosano) em *E. emarginata*. Foi demonstrada a resposta eletrofisiológica e comportamental das espécies *C. celata* e *C. cearae* aos odores florais emanados por suas respectivas plantas hospedeiras, *Philodendron acutatum* e *Taccarum ulei* (Araceae). Os ensaios eletrofisiológicos foram viabilizados graças a uma nova metodologia de preparação de antenas lameladas (características dos Scarabaeoidea), desenvolvida neste trabalho. Nos testes de eletrofisiologia (CG-EAD), antenas de machos e fêmeas adultos de *C. celata* e *C. cearae* responderam aos dois componentes majoritários presentes nos odores florais de *P. acutatum* e *T. ulei*: (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona e diidro- $\beta$ -ionona. As respostas comportamentais desses besouros aos odores florais, a diidro- $\beta$ -ionona sintética e à sua mistura a (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona evidenciam que estímulos químicos desencadeiam a resposta comportamental de busca desses besouros pela fonte emissora de odor. Por fim, foi demonstrado em ensaios eletrofisiológicos que antenas de fêmeas e machos adultos das espécies *C. forsteri*, *C. cearae* e *E. emarginata* podem responder a diversos voláteis orgânicos florais de estrutura química incomum presentes em plantas cantarófilas, tais como os compostos metoxilados anisol, 2-isopropil-3-metoxipirazina e 4-metoxiestireno, e o composto heterocíclico sulfurado 4-metil-5-viniltiazol.

**Palavras-chave:** Cantarofilia. *Cyclocephala*. *Erioscelis*. Eletrofisiologia. CG-EAD. Resposta comportamental. Besouros antófilos.

## ABSTRACT

In this thesis, aspects of the chemical ecology of species of beetles of the tribe Cyclocephalini (Melolonthidae; Dynastinae) were studied, related to their reproductive biology. Epicuticular extracts obtained through immersion of male and female *Cyclocephala cearae*, *C. celata* e *Erioscelis emarginata* in 1 mL hexane for 1 min were analysed through GC-MS for the characterization of the cuticular hydrocarbon profiles for each of the studied species. All profiles exhibited a predominance of aliphatic hydrocarbons with odd chain lengths, mainly alkanes and monounsaturated alkenes. The composition of these hydrocarbons differed among species, with a predominance of two C25 monounsaturated alkenes in *C. cearae*. In *C. celata* extracts, the predominant hydrocarbon is a C23 monounsaturated alkene, whereas in those of *E. emarginata*, hydrocarbons with relatively larger molecular weight are found and the major compound is the n-alkane heptacosane (C 27). Electrophysiological and behavioral response of *C. celata* and *C. cearae* to the floral odors emitted by their respective host plants, *Philodendron acutatum* and *Taccarum ulei*, were demonstrated. A new method for the preparation of lamellar antennae of Melolonthidae beetles, proposed here for the first time, made possible the electrophysiological tests (GC-EAD). In GC-EAD assays, antennae of male and female *C. celata* and *C. cearae* responded to the two major constituents in the floral odors of *P. acutatum* and *T. ulei*: (*S*)-2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone and dihydro- $\beta$ -ionone. The behavioral responses of these beetles to floral odors of their preferred hosts, to synthetic dihydro- $\beta$ -ionone and to its mixture with (*S*)-2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone showed that chemical stimuli trigger the search behavioral response of these beetles towards the scent emitting source. Lastly, it has been demonstrated in electrophysiological tests that male and female *C. forsteri*, *C. cearae* and *E. emarginata* can respond to several volatile organic compounds of unusual chemical structure present in cantarophilous plants, such as the methoxylated compounds anisole, 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazine and 4-methoxystyrene, and the heterocyclic sulfur-containing compound 4-methyl-5-vinylthiazole.

Keywords: *Cantarophily*. *Cyclocephala*. *Erioscelis*. Electrophysiology. GC-EAD. Behavioral response. Pollinating beetles.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** Classificação de semioquímicos (Adaptado de Zarbin et al 2009).....15
- Figura 1.2** Representação esquemática de: a) um olfatômetro de quatro vias; b) um olfatômetro de dupla escolha (tubo em Y) (Adaptado de: [cronodon.com/BioTech/Insect\\_Behaviour.html](http://cronodon.com/BioTech/Insect_Behaviour.html)) .....15
- Figura 1.3** Desenho esquemático do sistema de eletroantenografia (EAG) (Adaptado de: Syntech, 2004. *Electroantennography – A practical introduction*).....17
- Figura 1.4:** Representação esquemática de um cromatógrafo gasoso com detector de ionização por chama (FID) acoplado a um detector eletroantenográfico (EAD) (Adaptado de: Syntech, 2004. *Electroantennography – A practical introduction*).....18
- Figura 1.5:** A resposta típica obtida em experimento de EAG com antenas de insetos: (I) rápida despolarização; (II) retorno à linha de base (repolarização); (III) hiperpolarização; (IV) retorno à linha base. B: Exemplo de resposta dose-dependente. (Adaptado de: Embrapa, 2008).....19
- Figura 1.6:** Representação esquemática de antena lamelada presente em besouros da família Melolonthidae.....20
- Figura 1.7:** Imagens obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura da superfície das lamelas em antenas de *Cyclocephala celata* e *Cyclocephala latericia* da tribo Cyclocephalini (Melolonthidae; Dinastinae) em um equipamento da Freie Universität Berlin. (Fotos: Maia, A.C.D.).....20
- Figura 1.8:** Curvas de temperatura da espádice (linha cheia) e ar ambiente (linha pontilhada) durante 2 dias de florescimento para a arácea *Philodendron acutatum* (Adaptado de: Gibernau e Barabé, 2000).....23
- Figura 1.9:** . A: *Philodendron acutatum* (Araceae) (Foto: CATE Araceae, 2014), B: inflorescência de *P. acutatum* (Foto: A.C.D. Maia) .....28
- Figura 1.10:** A: *Philodendron mello-barretoanum* (Araceae) (Foto: G.K.N. Santos), B: inflorescência de *P. mello-barretoanum* no primeiro dia da antese (Foto: G.K.N. Santos).....29
- Figura 1.11:** A *Taccarum ulei* (Araceae) (Foto: G.K.N. Santos) B: Inflorescência de *T. ulei* no primeiro dia da antese (Foto: G.K.N. Santos) .....30
- Figura 1.12:** *Cyclocephala cearae* macho (Fotos: G.K.N. Santos).....31
- Figura 1.13:** *Cyclocephala celata* macho (A) e *C. celata* fêmea (B) (Fotos: G.K.N. Santos)...31
- Figura 1.14:** *Cyclocephala forsteri* fêmea. (Reproduzido de: Endrödi, S., 1963. Neue Cyclocephala-Arten. *Annales historico-naturales Musei nationalis hungarici*. Budapest 55:323-333.) .....31
- Figura 1.15:** *Erioscelis emarginata* (sexo indeterminado) (Foto: G.K.N. Santos).....32

<b>Figura 1.16:</b> Representação de clipeo com ápice arredondado (a) e emarginado (b) em <i>Cyclocephala</i> . (Adaptado de: Jameson et al, 2002).....	33
<b>Figura 1.17:</b> Representação de clipeo com ápice truncado (a) e emarginado (b) em <i>Erioscelis</i> . (Adaptado de: Jameson et al, 2002).....	33
<b>Figura 1.18:</b> Esternito apical de <i>Erioscelis emarginata</i> (Adaptado de: Saylor, 1946).....	34
<b>Figura 3.1:</b> Estrutura geral da cutícula dos insetos (Reproduzida de Gullan e Cranston, 2008).....	36
<b>Figura 3.2</b> Perfil cromatográfico de hidrocarbonetos cuticulares em <i>Cyclocephala cearae</i> amostrados por imersão dos insetos em hexano por 1min. (...)	43
<b>Figura 3.3</b> Perfil cromatográfico de hidrocarbonetos cuticulares em <i>Cyclocephala celata</i> amostrados por imersão dos insetos em hexano por 1min. (...)	44
<b>Figura 3.4</b> Perfil cromatográfico de hidrocarbonetos cuticulares em <i>Erioscelis emarginata</i> amostrados por imersão dos insetos em hexano por 1min. (...)	44
<b>Figura 3.5:</b> Perfil cromatográfico de extrato de cuticular de <i>Cyclocephala cearae</i> macho obtido por extração com sílica-gel.....	45
<b>Figura 4.1:</b> Equipamento de EAD utilizado (Foto: G.K.N. Santos).....	55
<b>Figura 4.2:</b> (A) Antena de <i>Cyclocephala celata</i> com as lamelas abertas e ponta distal inserida em um capilar contendo solução de Ringer. Visualização sob microscópio estereoscópico com aumento de 10X. (B) Antena montada entre os dois capilares com solução de Ringer. Aumento de 10X. (Fotos: G.K.N. Santos).....	56
<b>Figura 4.3:</b> Teste de olfatômetro em tubo em Y. Em detalhe, é mostrado o posicionamento do papel de filtro contendo o estímulo dentro do tubo. (Fotos: G.K.N. Santos).....	58
<b>Figura 4.4:</b> Resposta eletrofisiológica de antena de <i>Cyclocephala celata</i> (Melolonthidae; Dynastini) macho a ( <i>S</i> )-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona [1] e diidro- $\beta$ -ionona [2] presentes em uma amostra de <i>headspace</i> dinâmico obtido por aeração por 30 minutos de inflorescência de <i>Philodendron acutatum</i> (Araceae) (...)	61
<b>Figura 4.5:</b> Respostas (em %) de besouros <i>Cyclocephala celata</i> (Melolonthidae; Dynastini) aos estímulos testados em bioensaios de dupla escolha em olfatômetro em Y. (...)	63
<b>Figura 4.6</b> Respostas (em %) de besouros <i>Cyclocephala celata</i> (Melolonthidae; Dynastini) fêmeas ao extrato hexânico de cutícula de macho co-específico em teste de dupla escolha em olfatômetro em Y ( $p < 0,05$ ). (...)	65
<b>Figura 5.1:</b> Inflorescência de <i>Taccarum ulei</i> (Araceae) contendo besouros <i>Cyclocephala cearae</i> (Melolonthidae; Dynastini) coletados em Igarassu. (Foto: P. Bezerra).....	73

- Figura 5.2:** Resposta eletrofisiológica de uma antena de *Cyclocephala cearae* (Melolonthidae; Dynastini) macho aos compostos 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona [1] (-500  $\mu\text{V}$ ) e diidro- $\beta$ -ionona [2] (-240  $\mu\text{V}$ ) (...).78
- Figura 5.3:** Resposta eletrofisiológica de uma antena de *Cyclocephala cearae* (Melolonthidae; Dynastini) macho a 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona [1] (-260  $\mu\text{V}$ ) e para o terceiro composto majoritário CNI [3] (-100  $\mu\text{V}$ ) (...).79
- Figura 5.4:** Respostas (em %) de besouros *Cyclocephala cearae* (Melolonthidae; Dynastini) aos estímulos testados em bioensaios de dupla escolha em olfatômetro em Y. (...).81
- Figura 6.1:** Resposta eletrofisiológica de antena de *Erioscelis emarginata* (macho) a (*Z*)-pent-1-en-3-il-acetato (a) e (*Z*)-pent-2-en-1-il-acetato (b) presentes em uma amostra de *headspace* dinâmico de inflorescência de *Philodendron mello-barretoanum* durante a fase termogênica do primeiro dia da antese. (...).92
- Figura 6.2:** Resposta eletrofisiológica de antena de *Erioscelis emarginata* (fêmea) (*Z*)-pent-2-en-1-il-acetato [2], 4-metil-5-viniltiazol [4], 2-isopropil-3-metoxipirazina [5], 4-metoxiestireno [6] e 2-metoxi-3-(1-metoxipirazina) [7]. (...).93
- Figura 6.3:** Resposta eletrofisiológica de antena de *Erioscelis emarginata* (macho) a anisol [11]. (...).93
- Figura 6.4:** Resposta eletrofisiológica de antena de *Cyclocephala forsteri* fêmea a 4-metil-anisol (a) e 2-metoxi-3-(1-metilpropil)-pirazina (b) presentes em uma amostra de *headspace* dinâmico de inflorescência de *Acrocomia aculeata*. (...).94
- Figura 6.5:** Resposta eletrofisiológica de antena de *Cyclocephala forsteri* fêmea a metil-2-metil-butirato [1], 4-metil-5-viniltiazol [4], 2-isopropil-3-metoxipirazina [5], 4-metoxiestireno [6] e 2-metoxi-3-(1-metoxipirazina) [7]. (...).95
- Figura 6.6:** Resposta eletrofisiológica de antena de *C. forsteri* macho a anisol [11] e a 4-metil-anisol [14]. (...).96
- Figura 6.7:** Resposta eletrofisiológica de antena de *Cyclocephala cearae* fêmea a metil-2-metil-butirato [1], (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona [3], 4-metil-5-viniltiazol [4], 2-isopropil-3-metoxipirazina [5] e 4-metoxiestireno [6]. (...).97
- Figura 6.8:** Resposta eletrofisiológica de antena de *C. cearae* fêmea a anisol [11]. (...).97

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1** Perfil dos lipídeos cuticulares em três espécies de Cyclocephalini: *Cyclocephala cearae*, *C. celata* e *Erioscelis emarginata* amostrados por imersão em hexano por um 1 min....42
- Tabela 4.1** Composição do odor floral emitido durante a fase termogênica feminina em *Philodendron acutatum* (Araceae) (amostra usada nos testes comportamentais).....60
- Tabela 5.1** Composição do odor floral de *Taccarum ulei* (Araceae) na fase termogênica.....77
- Tabela 5.2** Respostas de besouros *Cyclocephala cearae* (Melolonthidae; Dynastini) ao odor floral de *Taccarum ulei* (Araceae), e aos compostos majoritários nos bioensaios em tubo em Y.....80
- Tabela 6.1** Compostos sintéticos utilizados na preparação de misturas para os ensaios eletroantegráficos.....88
- Tabela 6.2** Composição do odor floral em *Philodendron mello-barretoanum* (Araceae) [P.mel] e *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) [A.acu].....91

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>15</b>
1.1	COMUNICAÇÃO QUÍMICA EM INSETOS.....	15
1.2	TRIBO CYCLOCEPHALINI (MELOLONTHIDAE; DYNASTINAE).....	19
1.3	IMPORTÂNCIA DA TRIBO CYCLOCEPHALINI (MELOLONTHIDAE; DYNASTINAE) NA POLINIZAÇÃO DE ANGIOSPERMAS NEOTROPICAL.....	21
1.4	SEMIOQUÍMICOS DE PLANTAS COMO ATRAENTES DE BESOUROS ESCARABEÍDEOS.....	24
1.5	ESPÉCIES ESTUDADAS.....	27
1.5.1	<b>Plantas.....</b>	<b>27</b>
1.5.1.1	Classificação (NCBI taxonomy, 2015).....	27
1.5.1.2	<i>Philodendron acutatum</i> Schott (Philodendreae).....	27
1.5.1.3	<i>Philodendron mello-barretoanum</i> R. Burle-Marx ex G.M. Barroso (Philodendreae).....	28
1.5.1.4	<i>Taccarum ulei</i> Eng. & K. Krause (Araceae, Spathicarpeae).....	29
1.5.2	<b>Besouros.....</b>	<b>30</b>
1.5.2.1	Classificação (adaptada de Bouchard et al (2011)).....	30
1.5.2.2	<i>Cyclocephala</i> Dejean, 1821.....	32
1.5.2.3	<i>Erioscelis</i> Burmeister, 1847.....	33
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>3</b>	<b>COMPOSIÇÃO TÁXON-ESPECÍFICA NO PERFIL DE HIDROCARBONETOS CUTICULARES DE <i>Cyclocephala cearae</i>, <i>C. celata</i> E <i>Erioscelis emarginata</i> (MELOLONTHIDAE, CYCLOCEPHALINI).....</b>	<b>36</b>
3.1	INTRODUÇÃO.....	36
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.2.1	Preparação dos extratos de cutículas de Cyclocephalini em hexano.....	38
3.2.2	Preparação dos extratos de cutículas de <i>Cyclocephala cearae</i> com sílica- gel.....	39
3.2.3	Análise dos extratos cuticulares.....	40
3.3	RESULTADOS.....	41
3.3.1	Perfil de hidrocarbonetos em <i>Cyclocephala cearae</i> , <i>C. celata</i> e <i>Erioscelis emarginata</i> extraídos com hexano.....	41
3.3.2	Extração de hidrocarbonetos cuticulares com sílica-gel.....	45
3.4	DISCUSSÃO.....	46
3.5	CONCLUSÕES.....	48

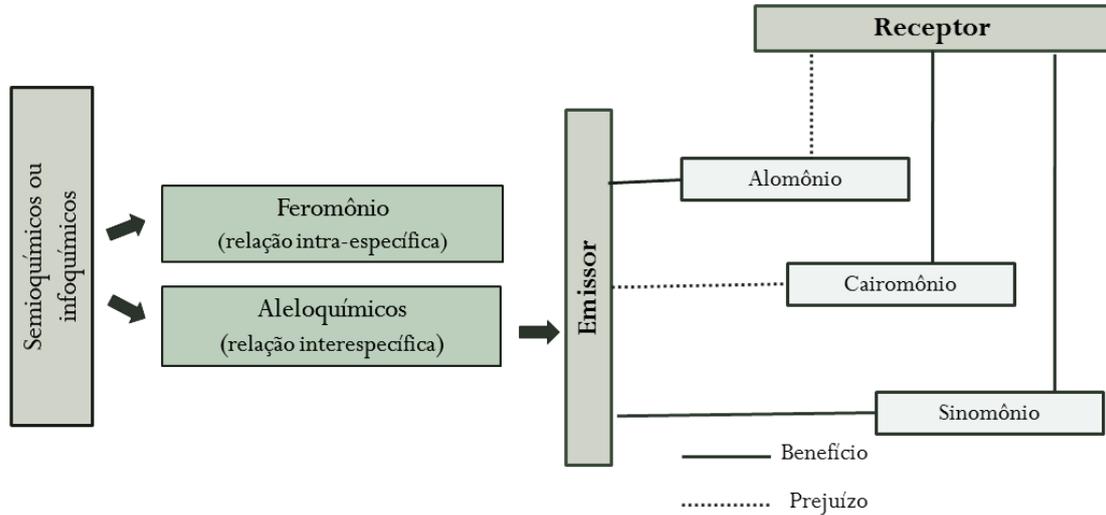
<b>4</b>	<b>RESPOSTA ELETROFISIOLÓGICA E COMPORTAMENTAL DE <i>Cyclocephala celata</i> (MELOLONTHIDAE; DYNASTINAE; CYCLOCEPHALINI) AO ODOR FLORAL DE <i>Philodendron acutatum</i> (ARACEAE) E A EXTRATOS CUTICULARES CO-ESPECÍFICOS.....</b>	<b>49</b>
4.1	INTRODUÇÃO.....	49
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.2.1	Área de coleta.....	52
4.2.2	Extração de voláteis florais.....	52
4.2.3	Análise de voláteis por Cromatografia gasosa (CG) e Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CGEM).....	53
4.2.4	Coleta de besouros.....	54
4.2.5	Testes eletrofisiológicos.....	54
4.2.6	Preparação dos extratos de cutículas de <i>Cyclocephala celata</i> em hexano...	57
4.2.7	Testes comportamentais.....	57
4.2.7.1	Testes com voláteis florais.....	58
4.2.7.2	Testes com extratos cuticulares.....	59
4.2.7.3	Análises estatísticas.....	59
4.3	RESULTADOS.....	60
4.3.1	Voláteis florais.....	60
4.3.2	Eletroantenografia em <i>Cyclocephala celata</i> .....	60
4.3.3	Respostas para os testes de dupla escolha em olfatômetro.....	62
4.3.4	Resposta de <i>Cyclocephala celata</i> ao teste com extrato cuticular.....	64
4.4	DISCUSSÃO.....	65
4.4.1	Odores florais.....	65
4.4.2	Respostas eletrofisiológicas.....	65
4.4.3	Respostas obtidas no olfatômetro em Y.....	67
4.5	CONCLUSÕES.....	69
<b>5</b>	<b>RESPOSTA ELETROFISIOLÓGICA E COMPORTAMENTAL DE <i>Cyclocephala cearae</i> (MELOLONTHIDAE; DYNASTINAE; CYCLOCEPHALINI) AOS ODORES FLORAIS DE <i>Taccarum ulei</i> (ARACEAE).....</b>	<b>70</b>
5.1	INTRODUÇÃO.....	70
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
5.2.1	Áreas de coleta.....	72
5.2.2	Manutenção dos besouros em laboratório.....	73
5.2.3	Extração de voláteis florais.....	73
5.2.4	Análise de voláteis florais.....	74
5.2.5	Testes eletrofisiológicos.....	75
5.2.6	Testes comportamentais em tubo em Y.....	75
5.2.7	Análises estatísticas.....	76
5.3	RESULTADOS.....	77
5.3.1	Odor floral de <i>Taccarum ulei</i> .....	77

5.3.2	Respostas eletrofisiológicas obtidas por GC-EAD.....	77
5.3.3	Respostas para os testes em olfatômetro em Y.....	79
5.4	DISCUSSÃO.....	82
5.5	CONCLUSÕES.....	83
<b>6</b>	<b>RESPOSTA ELETROFISIOLÓGICA DE <i>Erioscelis emarginata</i>, <i>Cyclocephala forsteri</i> E <i>C. cearae</i> (MELOLONTHIDAE; DYNASTINAE; CYCLOCEPHALINI) A COMPOSTOS PRESENTES EM PLANTAS CANTARÓFILAS.....</b>	<b>84</b>
6.1	INTRODUÇÃO.....	84
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	86
<b>6.2.1</b>	<b>Coleta de besouros.....</b>	<b>86</b>
<b>6.2.2</b>	<b>Testes eletroantegráficos GC-EAD.....</b>	<b>87</b>
6.3	RESULTADOS.....	90
<b>6.3.1</b>	<b>Composição dos odores florais.....</b>	<b>90</b>
<b>6.3.2</b>	<b>Testes eletrofisiológicos.....</b>	<b>91</b>
6.3.2.1	<i>Erioscelis emarginata</i> .....	91
6.3.2.2	<i>Cyclocephala forsteri</i> .....	94
6.3.2.3	<i>Cyclocephala cearae</i> .....	96
6.4	DISCUSSÃO.....	98
<b>6.4.1</b>	<b>Composição dos odores florais.....</b>	<b>98</b>
<b>6.4.2</b>	<b>Testes eletrofisiológicos.....</b>	<b>98</b>
6.5	CONCLUSÕES.....	100
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>101</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>102</b>

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 COMUNICAÇÃO QUÍMICA EM INSETOS

Informação sensorial constitui a base de todas as interações entre um organismo e o meio ambiente. As substâncias químicas envolvidas na comunicação entre os seres vivos são chamadas de semioquímicos ou infoquímicos (Law e Regnier, 1971). O segundo termo leva em consideração o caráter benéfico ou prejudicial da interação do ponto de vista evolutivo (Sabelis e Dicke, 1987). Os infoquímicos podem ser agrupados em duas categorias: feromônios, que medeiam interações intraespecíficas e aleloquímicos que medeiam interações entre organismos de espécies distintas (Figura 1.1). Os aleloquímicos são classificados de acordo com o organismo que está sendo beneficiado na comunicação. Quando a interação é benéfica apenas para a espécie emissora, o composto é chamado alomônio, quando é benéfica apenas para a espécie receptora é denominado cairomônio e quando o benefício é mútuo, a substância é um sinomônio (Sabelis e Dicke, 1987).



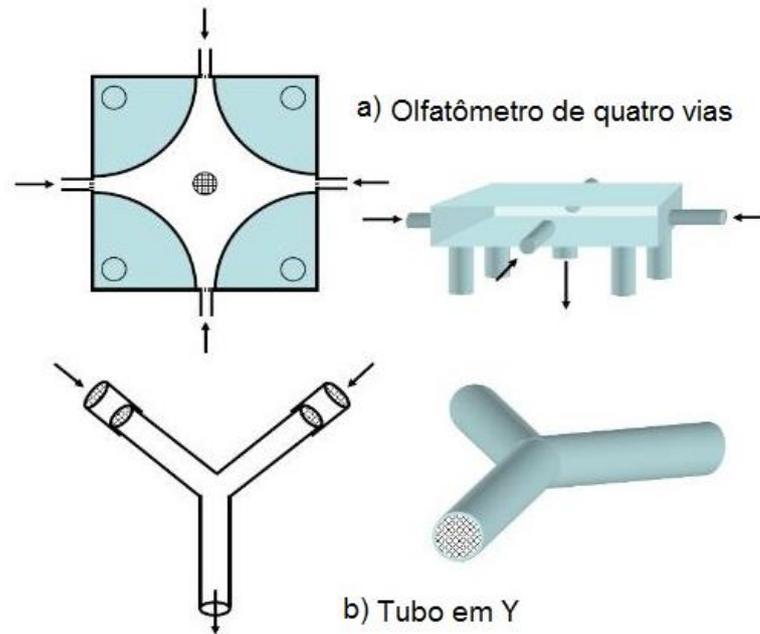
**Figura 1.1:** Classificação de semioquímicos (Adaptado de Zarbin et al 2009)

Nos insetos, o estímulo químico é percebido através de células receptoras (quimiorreceptores) que estão presentes nas sensilas olfativas, as quais são responsáveis pela conversão dos estímulos químicos (odores) em potenciais elétricos. As sensilas olfatórias estão presentes principalmente nas antenas, mas também são encontradas em outras regiões do tegumento como mandíbulas, palpos, tarsos, ovipositor e outros. Elas podem ser generalistas,

quando respondem a uma grande variedade de odores, normalmente voláteis de plantas; ou especialistas, quando respondem a uma ou poucas substâncias, normalmente feromônios. A sensibilidade e seletividade da antena a um determinado odor estão diretamente relacionadas à concentração do estímulo químico, ao tamanho e à forma da antena, assim como ao número, tipo e localização das sensilas olfativas presentes em determinada espécie (Gillot, 2005; Gullan e Cranston, 2008) Fatores como idade, condição alimentar e *status* de cópula também podem afetar a percepção olfativa dos insetos (Altafini, 2008).

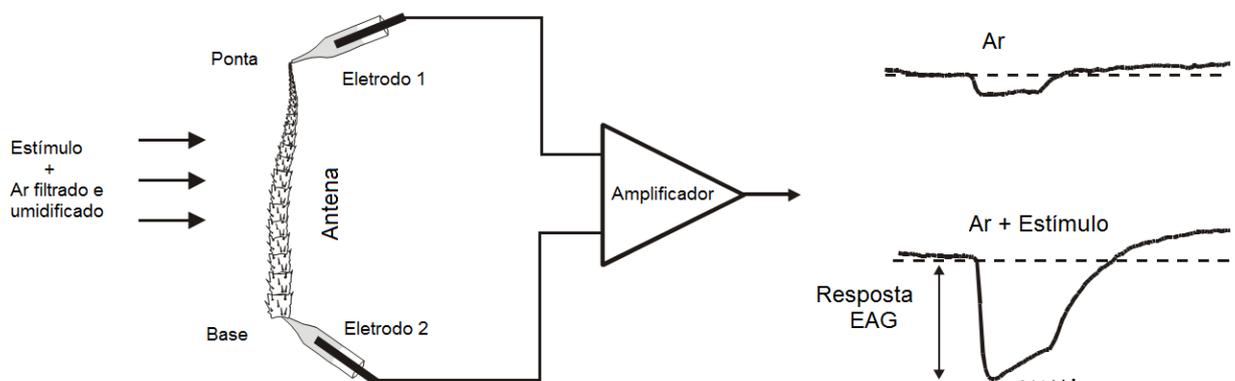
A resposta dos insetos a um estímulo é caracterizada de acordo com o tipo de movimento provocado, direção e sentido do deslocamento, ou ausência de movimento (Matthews e Matthews, 2010). Em geral, os insetos podem apresentar uma resposta direcionada (taxia) ou não direcionada (quinese). A taxia pode ser positiva, quando o inseto se locomove em direção à fonte do estímulo, ou negativa, quando o inseto se locomove no sentido contrário. São tipos de taxia: a quimiotaxia, orientação induzida por um agente químico, a anemotaxia, orientação em resposta ao vento e a fototaxia, resposta a uma fonte luminosa. Entre os tipos de quineses, pode-se citar a ortoquinese, que se caracteriza como o movimento randômico de um organismo em resposta a um estímulo e a clinoquinese, definida como a mudança aleatória na taxa ou frequência de giro durante o vôo (Matthews e Matthews, 2010).

O estudo da função dos odores na comunicação química de insetos é realizado por meio de bioensaios comportamentais. Em laboratório, o comportamento dos insetos pode ser avaliado por bioensaios em olfatômetros e túnel de vento, que permitem qualificar e quantificar a resposta do inseto a determinado estímulo. Ambos os tipos possuem um ponto de liberação do estímulo e um ponto de liberação do organismo a ser testado. Nos olfatômetros, os insetos podem escolher entre duas ou mais opções diferentes, sendo normalmente um branco ou controle e um ou mais compostos (Figura 1.2).



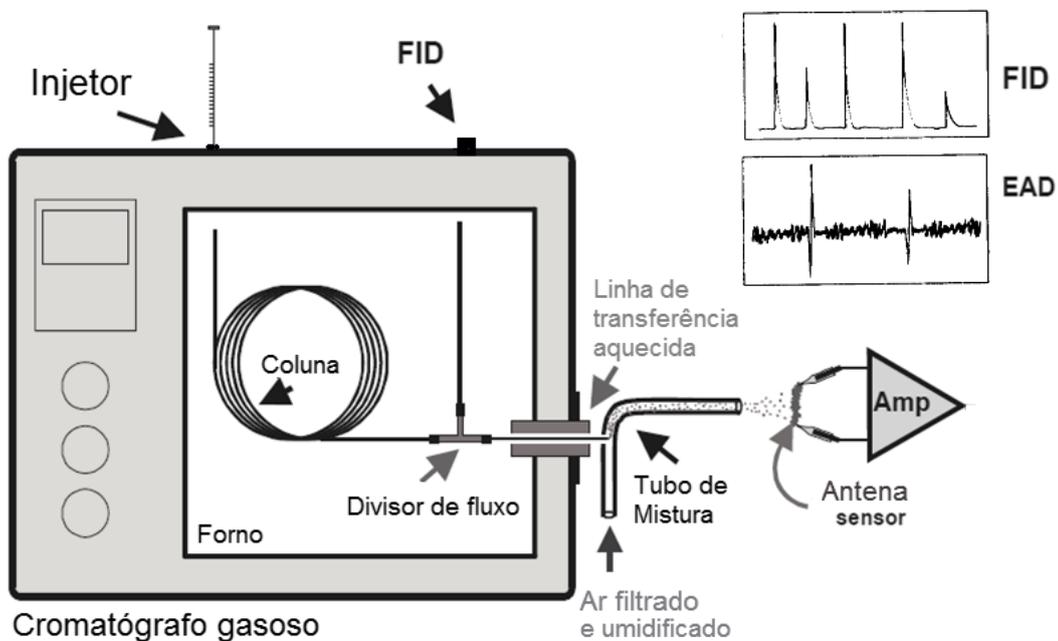
**Figura 1.2:** Representação esquemática de: a) um olfatosmetro de quatro vias; b) um olfatosmetro de dupla escolha (tubo em Y) (Adaptado de: [cronodon.com/BioTech/Insect\\_Behaviour.html](http://cronodon.com/BioTech/Insect_Behaviour.html))

Outra ferramenta para o estudo de compostos bioativos é a eletrofisiologia. Em estudos de identificação de semioquímicos, as técnicas de eletroantenografia (EAG) e cromatografia gasosa acoplada à eletroantenografia (CG-EAD) são as mais usadas. A técnica de EAG (Figura 1.3) consiste na exposição de estímulos químicos às sensilas olfativas dos insetos. O reconhecimento do estímulo pelo organismo gera um potencial elétrico que é amplificado e registrado em milivolts.



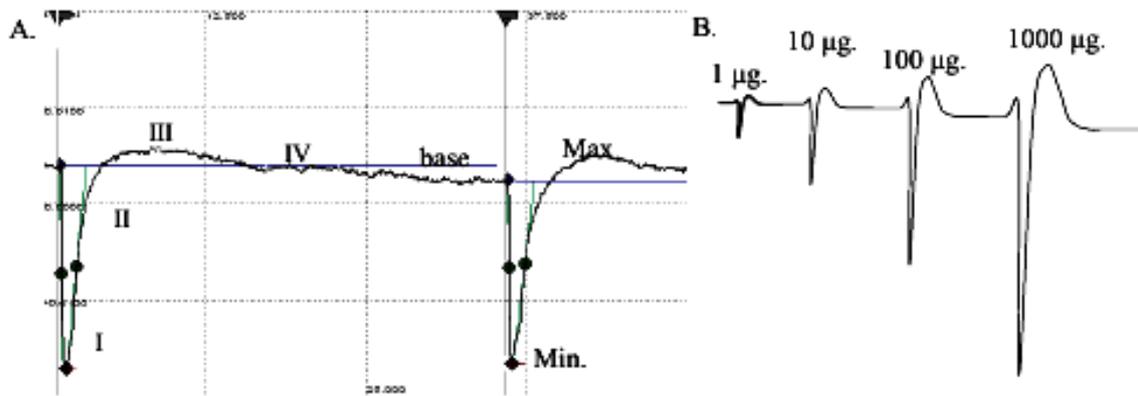
**Figura 1.3:** Desenho esquemático do sistema de eletroantenografia (EAG) (Adaptado de: Syntech, 2004. *Electroantennography – A practical introduction*)

Quando acoplado a um cromatógrafo gasoso, o sistema eletroantenográfico permite que se faça a seleção de compostos bioativos, como etapa prévia aos bioensaios comportamentais, reduzindo o tempo investido na seleção de componentes de interesse em misturas complexas (Bergström, 2008; Gomes, 2011). O cromatógrafo gasoso apresenta alta resolução na separação de misturas de compostos em solução, permitindo a análise de misturas complexas obtidas diretamente do inseto ou da planta sem prévios tratamentos. Cada componente da mistura chega à antena do inseto separadamente, de acordo com seu tempo de eluição na coluna cromatográfica. O efluente da coluna do cromatógrafo é separado por um divisor de fluxo e enviado simultaneamente ao detector de ionização de chama (FID) e ao EAG (Figura 1.4).



**Figura 1.4:** Representação esquemática de um cromatógrafo gasoso com detector de ionização por chama (FID) acoplado a um detector eletroantenográfico (EAD) (Adaptado de: Syntech, 2004. Electroantennography – A practical introduction)

O sinal da antena registrado pelo EAD pode ser dividido em quatro fases (Figura 1.5A): (I) uma rápida despolarização; (II) repolarização da antena; (III) hiperpolarização, seguido de (IV) um lento retorno à linha base. A intensidade da resposta geralmente depende da concentração do composto testado, com concentrações maiores resultando em despolarizações mais intensas (Figura 1.5B) (EMBRAPA, 2008).



**Figura 1.5:** A resposta típica obtida em experimento de EAG com antenas de insetos: (I) rápida despolarização; (II) retorno à linha de base (repolarização); (III) hiperpolarização; (IV) retorno à linha base. B: Exemplo de resposta dose-dependente. (Adaptado de: Embrapa, 2008).

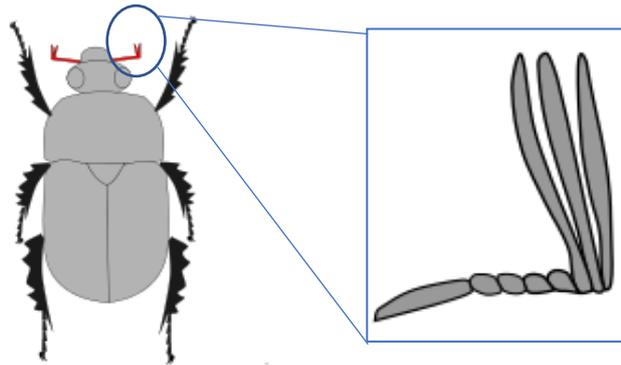
## 1.2 TRIBO CYCLOCEPHALINI (MELOLONTHIDAE; DYNASTINAE)

A ordem Coleoptera engloba a maior diversidade de insetos, com mais de 360.000 espécies descritas (Bouchard et al., 2011). Entre as superfamílias pertencentes a esta ordem destaca-se Scarabaeoidea Latreille, 1802, a qual compreende diversas famílias cujo número varia de acordo com o sistema de classificação escolhido. Atualmente, não há consenso entre os sistemas de classificação e são necessárias análises filogenéticas que envolvam linhagens representativas de todas as regiões biogeográficas para que uma proposta de classificação seja adotada (Cherman e Morón, 2014). Neste trabalho, utilizaremos a classificação de Endrödi (Endrödi, 1966) que é amplamente usada por pesquisadores da América Latina. Nesta classificação, a subfamília Dynastinae MacLeay, 1819 é considerada como parte da família Melolonthidae Leach, 1819. Devido à falta de consenso entre os pesquisadores, no entanto, vários trabalhos na literatura consideram espécies de Melolonthidae como pertencentes à família Scarabaeidae Latreille, 1802.

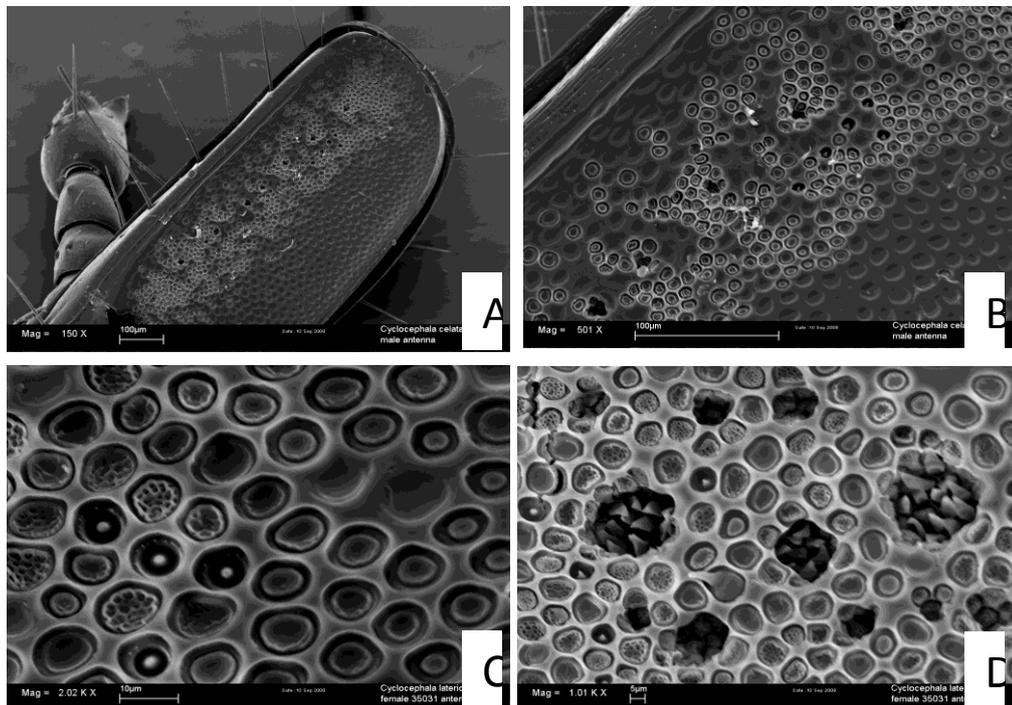
De acordo com a classificação de Endrödi (1966), Melolonthidae engloba as linhagens de Scarabaeoidea com hábito fitófago ou fitosaprófago em estágio larval e/ou adulto e abrange três subfamílias mais importantes: Rutelinae MacLeay, 1819, Dynastinae Leach, 1819 e Melolonthinae Samouelle, 1819 (Cherman e Morón, 2014). Espécies dessa família são

encontradas em todos os habitats continentais (exceto em ambientes com gelo perene), desde o solo até o dossel (Romero-Lopez, 2016).

Uma das características distintivas destes besouros é a presença de antenas com 8 a 10 antenômeros, com os últimos 3 a 7 antenômeros formando uma clava lamelada ou pectinada (Figura 1.6). A superfície interna das lamelas é recoberta por sensilas olfativas (Leal, 1998) (Figura 1.7).



**Figura 1.6:** Representação esquemática de antena lamelada presente em besouros da família Melolonthidae.



**Figura 1.7:** Imagens obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura da superfície das lamelas em antenas de *Cyclocephala celata* e *Cyclocephala latericia* da tribo Cyclocephalini (Melolonthidae; Dinastinae) em um equipamento da Freie Universität Berlin. (Fotos: Maia, A.C.D.)

Os besouros da família Melolonthidae apresentam dieta bastante diversificada, alimentando-se de folhas, flores, talos, frutos, néctar, seiva, córtex e detritos vegetais. Há ainda espécies consideradas insetos-praga que causam enormes danos em jardins e áreas de cultivo, como o besouro *Popillia japonica* (Rutelinae; Melolonthidae) que se alimenta de folhas, flores e frutos de mais de 300 espécies de plantas (Gillot, 2005).

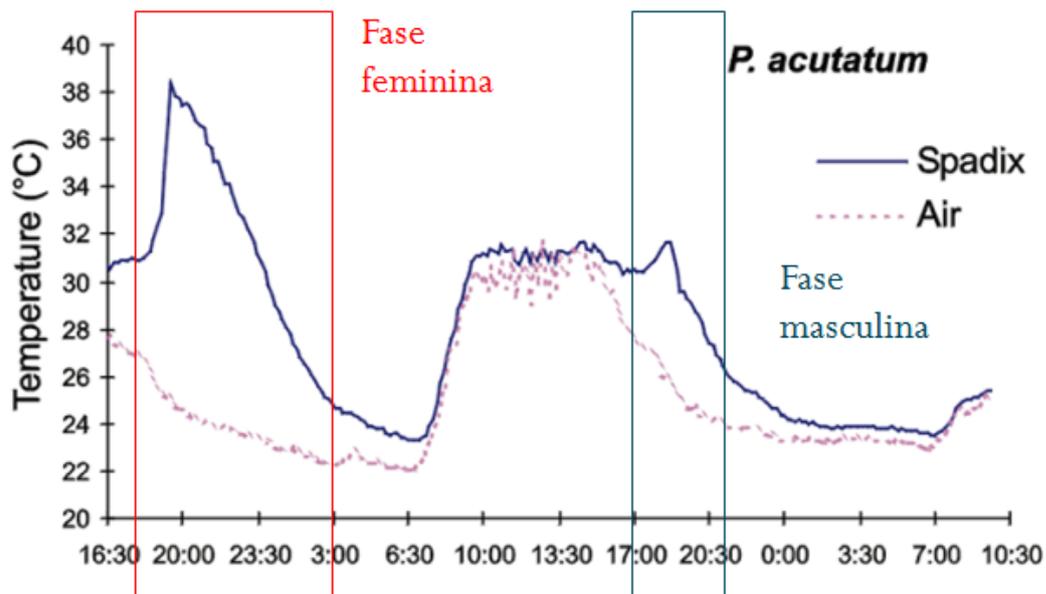
A tribo Cyclocephalini Laporte 1840, pertencente à subfamília Dynastinae MacLeay, 1819, contém cerca de 500 espécies distribuídas em 15 gêneros (Clark, 2011; Jameson et al., 2002). Em treze dos 15 gêneros de Cyclocephalini, está presente o dimorfismo sexual no primeiro par de pernas, que apresenta protarso claramente alargado nos machos, com a garra mediana (ou interna) muito maior que a garra externa (Ratcliffe e Cave, 2009; Smith, 2006). Nas fêmeas, há ausência de diferenciação tarsal, mas está presente uma extensão na epipleura elitral, que pode desempenhar papel importante no acasalamento. Os outros dois gêneros da tribo (*Erioscelis* Burmeister e *Stenocrates* Burmeister) não apresentam dimorfismo sexual (Moore, 2012). *Cyclocephala* Dejean, 1821 é o gênero mais diverso da tribo, apresentando cerca de 350 espécies, com distribuição geográfica predominantemente neotropical, ocorrendo do extremo sudeste do Canadá até o sul da Argentina (Ratcliffe e Cave, 2009). Novas espécies têm sido continuamente descritas neste gênero (Grossi et al., 2016; Mora-Aguilar e Delgado, 2012; Ratcliffe, 2008; Ratcliffe e Cave, 2009; Ratcliffe e Hoffman, 2011). Os adultos de *Cyclocephala* têm hábito noturno ou crepuscular e são atraídos por luzes à noite (Buss, 2006; Gottsberger, 1989; Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 1991; Gottsberger et al., 2013).

### 1.3 IMPORTÂNCIA DA TRIBO CYCLOCEPHALINI (MELOLONTHIDAE; DYNASTINAE) NA POLINIZAÇÃO DE ANGIOSPERMAS NEOTROPICAIS

Muitas espécies de Cyclocephalini foram identificadas como polinizadores importantes de angiospermas. A cantarofilia (polinização por besouros) é considerada como a forma mais basal de polinização por insetos. Os besouros transferem pólen ao visitarem as flores para se alimentar ou acasalar (Ratcliffe e Cave, 2009). Plantas polinizadas por coleópteros frequentemente apresentam flores brancas ou pouco coloridas que exalam um forte aroma, que pode ser adocicado ou semelhante ao de material em decomposição (Bernhardt, 2000; Gibernau et al., 1999). Em relação à forma das flores, podem-se distinguir duas configurações básicas: flores grandes individuais e bissexuadas, com formato de prato ou tigela (como em *Magnolia*) ou minúsculas flores individuais, frequentemente unissexuadas, dispostas em um ramo que pode ser exposto, como em *Arecaceae*, ou protegidas por uma ou mais brácteas florais, como

em Araceae e Cyclanthaceae. Ambos os tipos de flores são normalmente grandes o suficiente para permitir a visita e/ou abrigar em seu interior vários besouros ao mesmo tempo (Bernhardt, 2000). Como recompensa alimentar, os besouros antófilos encontram pólen em abundância, tecidos nutritivos ou néctar facilmente acessíveis, o que minimiza danos às estruturas florais férteis (Silberbauer-Gottsberger et al., 2003). Adicionalmente, na maioria das plantas cantarófilas os ovários encontram-se protegidos das peças bucais mastigadoras dos coleópteros (Gullan e Cranston, 2008).

Uma característica presente em muitas plantas cantarófilas é a termogênese floral, fenômeno que facilita a volatilização dos odores florais (Gottsberger, 1990; Seymour e Schultze-Motel, 1997). Além de aumentar a emissão de odores, o aumento da temperatura nos tecidos florais pode ter outras funções ecológicas, como oferecer aos coleópteros visitantes uma recompensa energética (Ervik e Knudsen, 2003; Seymour et al, 2009; Schatz, 1990). Flores termogênicas são usualmente protogínicas (órgãos femininos amadurecem primeiro) e a polinização acontece antes da liberação do pólen pelas anteras. Desta forma, os besouros são atraídos pela inflorescência, trazendo pólen de outras plantas e realizando a fertilização cruzada. A disponibilidade de alimento, abrigo e calor na câmara floral podem incentivar os besouros a permanecerem no interior da inflorescência até o término da receptividade das partes femininas (flores pistiladas) e liberação do pólen pelas flores masculinas (flores estaminadas). Os besouros são então encorajados a sair, carregando o pólen a outras inflorescências receptivas. Alternativamente, os coleópteros podem ser fisicamente presos pelo fechamento da inflorescência. O início da receptividade das partes femininas corresponde ao principal evento de produção de calor nas plantas termogênicas, e é quando os voláteis florais são emitidos de forma mais intensa (Figura 1.8). Os aromas liberados durante a fase termogênica variam desde perfumes adocicados a odores nauseabundos (Broderbauer et al., 2012; Pellmyr e Thien, 1986; Seymour e Schultze-Motel, 1997).



**Figura 1.8:** Curvas de temperatura da espádice (linha cheia) e ar ambiente (linha pontilhada) durante 2 dias de florescimento para a aráceia *Philodendron acutatum* (Adaptado de: Gibernau e Barabé, 2000)

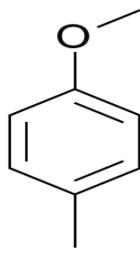
A cantarofilia tem importância indiscutível em ecossistemas tropicais e subtropicais. De acordo com Bernhardt (2000), mais de 180 espécies de angiospermas são polinizadas quase que exclusivamente por coleópteros pertencentes a 85 gêneros em 34 famílias. Uma estimativa mais abrangente de Schatz (1990) aponta para 900 espécies de angiospermas que dependem dos besouros antófilos na região tropical. Já uma revisão da literatura mais recente realizada por Moore e Jameson (2013) relata que pelo menos 97 espécies de escarabeídeos da tribo Cyclocephalini foram registrados como polinizadores em 58 gêneros botânicos pertencentes a 17 famílias e 15 ordens. Famílias como Araceae, Nymphaeaceae e Annonaceae possuem grande número de espécies polinizadas por coleópteros (Bernhardt, 2000; Ervik e Knudsen, 2003; Moore e Jameson, 2013; Schatz, 1990; Silberbauer-Gottsberger, 1990). A interação entre besouros Cyclocephalini e termogênese floral em Araceae já foi documentada para *Philodendron* spp. (Gibernau e Barabé, 2000, 2002; Gibernau et al., 1999; Gottsberger, 1990; Gottsberger e Amaral Jr., 1984; Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 1991; Gottsberger et al., 2013; Maia et al., 2010; Pereira et al., 2014; Seymour, 1999), *Taccarum ulei* (Maia et al., 2013a), *Caladium bicolor* (Maia e Schlindwein, 2006), *Montrichardia arborescens* (Gibernau et al., 2003), e *Dieffenbachia* spp. (Beath, 1999; Valerio, 1984).

As inflorescências geralmente funcionam como sítios de agregação para os Cyclocephalini antófilos. Eles se acasalam dentro da câmara floral, beneficiando-se do calor liberado pelas inflorescências para manter seus altos níveis de atividade metabólica (Seymour e Matthews, 2006; Seymour et al., 2009). Os compostos voláteis florais atraem besouros de ambos os sexos e a cópula ocorre dentro das câmaras florais. Os coleópteros permanecem no interior das inflorescências durante o dia e partem em busca de novas inflorescências ao cair da noite, cobertos com pólen liberado pela inflorescência que os abrigou no dia anterior (Moore e Jameson, 2013).

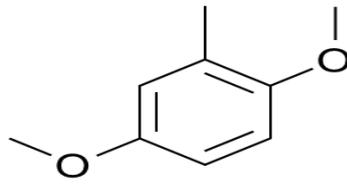
#### 1.4 SEMIOQUÍMICOS DE PLANTAS COMO ATRAENTES DE BESOUROS ESCARABEÍDEOS

Embora a literatura sobre a biologia de polinização em plantas cantarófilas seja relativamente extensa, poucos estudos investigaram os odores florais emitidos pelas plantas. Dados sobre a resposta dos besouros Cyclocephalini aos odores florais provenientes das plantas por eles polinizadas são ainda mais escassos. Apesar disto, uma variedade de compostos tem sido descritos em plantas polinizadas por besouros. Knudsen et al (2006) elaboraram uma classificação para os constituintes dos odores florais, dividindo os compostos em sete classes de acordo com suas estruturas químicas e vias biossintéticas conhecidas. São elas: compostos alifáticos, benzenóides e fenilpropanóides, compostos ramificados com 5 átomos de carbono, terpenóides (incluindo monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e terpenos irregulares), compostos contendo nitrogênio, compostos contendo enxofre e uma classe que engloba compostos cíclicos diversos. Em plantas polinizadas por besouros Cyclocephalini já foram descritos benzenóides metoxilados e hidroxilados incomuns, compostos ramificados de cadeia C5, terpenóides oxigenados e derivados de ácidos graxos (Azuma et al., 1997; Ervik e Knudsen, 2003; Ervik et al., 1999; Gibernau et al., 2003; Maia et al., 2010, 2013b).

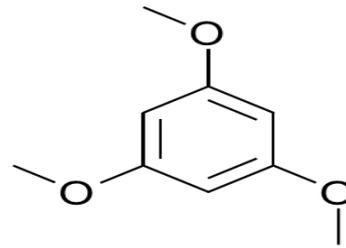
Benzenóides metoxilados estão presentes em várias espécies de plantas cantarófilas. Um exemplo é o 4-metil-anisol [1], que chega a representar mais de 99% do odor floral em espécies de *Phytelephas* (Arecaceae) (Ervik et al., 1999). Em *Nymphaea lotus* o benzenóide 2,5-dimetoxi-tolueno [2] é um dos compostos majoritários (Ervik e Knudsen, 2003). O benzenóide metoxilado 1,3,5-trimetoxibenzeno [3] foi identificado em duas espécies de Araceae: *Montrichardia arborescens* (Gibernau et al., 2003) e *Caladium bicolor* (Maia et al., 2013b).



[1]

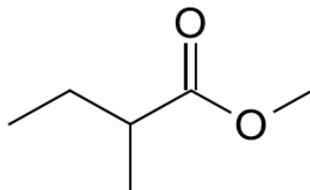


[2]

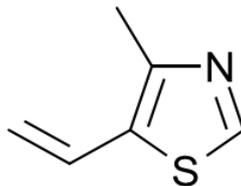


[3]

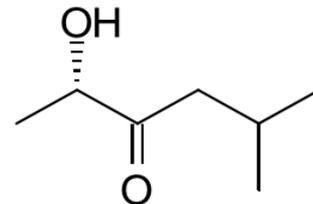
A resposta comportamental para os compostos presentes nos odores florais foi verificada apenas em poucos estudos, geralmente através de armadilhas ou iscas em forma de flores contendo o composto majoritário presente no odor floral. Gottsberger et al (2012) conseguiram comprovar a atração de *Cyclocephala literata* a 2-metilbutanoato de metila [4], principal componente do odor floral de *Magnolia ovata* (Magnoliaceae), por meio de réplicas de flores contendo o composto. De forma semelhante, Maia et al. (2012) comprovaram a atração de três espécies de *Cyclocephala* ao composto 4-metil-5-viniltiazol [5], um composto heterocíclico contendo nitrogênio e enxofre, presente em *Annona* spp (Annonaceae). e *Caladium bicolor* (Araceae). Outro composto que se mostrou ativo na atração de besouros Cyclocephalini é a aciloína alifática (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona [6] (Maia et al., 2013a).



[4]



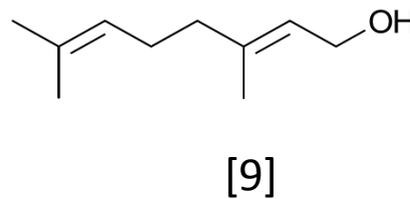
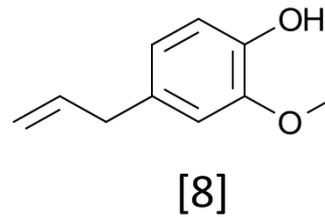
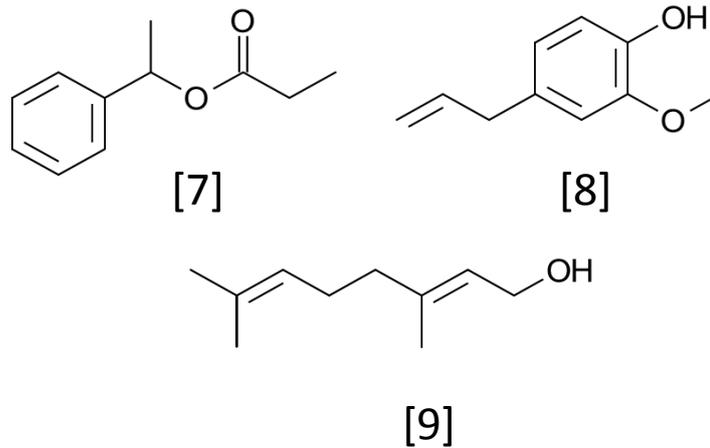
[5]



[6]

Investigações de atraentes de plantas para outros besouros Cyclocephaline têm se concentrado em espécies-praga. Uma espécie que tem sido estudada intensamente é o besouro japonês *Popillia japonica* Newman (Rutelinae; Melolonthidae), introduzido nos Estados Unidos no início do século passado. O besouro japonês se tornou o mais difundido e destrutivo inseto-praga de relva e pastagem, afetando também culturas de milho, soja e frutíferas. *Popillia japonica* é também um modelo valioso para o estudo de interações inseto-plantas. Besouros japoneses são altamente polívoros (alimentam-se de uma variedade grande de espécies de plantas de diferentes famílias), locomovem-se bastante e possuem ciclo de vida relativamente longo, oferecendo informações importantes sobre o comportamento, fisiologia e ecologia nutricional

de herbívoros com dietas generalistas. Semioquímicos tem sido estudados extensivamente para esta espécie, desde feromônios, compostos sintéticos e kairomônios presente em uma ampla variedade de plantas, na tentativa de desenvolver armadilhas eficazes para captura dos besouros. Uma isca bastante eficiente foi formulada com base em estudos de ecologia química do besouro japonês, composta por uma mistura de propionato de fenetila [7], eugenol [8] e geraniol [9] na proporção de 3 : 7 : 3. O feromônio sintético de *P. japonica*, japonilure, também é usado para a captura desses insetos, sozinho ou em conjunto com os atraentes de plantas. (Donaldson et al., 1986, 1990; Larsson et al., 2003; Potter e Held, 2002).



## 1.5 ESPÉCIES ESTUDADAS

### 1.5.1 Plantas

#### 1.5.1.1 Classificação (NCBI taxonomy, 2015)

Família: Araceae Juss.

Subfamília: Aroidea

Tribo: Philodendreae

Gênero: *Philodendron* Schott

*Philodendron acutatum* Schott

*Philodendron mello-barretoanum* R. Burle-Marx ex G.M. Barroso

Tribo: Spathicarpeae

Gênero: *Taccarum* Brongn. ex Schott

*Taccarum ulei* Eng. & K. Krause

#### 1.5.1.2 *Philodendron acutatum* Schott (Philodendreae)

*Philodendron acutatum* é uma planta herbácea de hábito hemiepífita encontrada em áreas de borda e clareiras de florestas tropicais úmidas (Figura 1.9, A e B), podendo ocorrer também em campos rupestres e afloramentos rochosos. Populações de *P. acutatum* podem ser encontradas desde o norte da América do Sul até o Sudeste brasileiro, até mesmo em áreas de afloramento rochoso na Caatinga (Gibernau e Barabé, 2000). As folhas desta espécie são sagitadas com longos pecíolos e de coloração verde-escura. As inflorescências apresentam uma espádice com 18 a 19 cm de comprimento que é recoberta por flores unissexuadas e dividida ao longo de seu eixo vertical em três zonas distintas. A porção apical é ocupada por flores masculinas férteis, de coloração branca, que ocupam cerca de dois terços do comprimento da espádice. A porção mais basal da espádice, de coloração amarelada, é ocupada por flores femininas férteis. Entre as duas regiões encontra-se uma zona de transição, composta de flores masculinas estéreis de cor branca, com 4 a 6 mm de comprimento. A espádice é envolta por uma espata com 18 a 20 cm de comprimento que apresenta coloração externa verde. A face

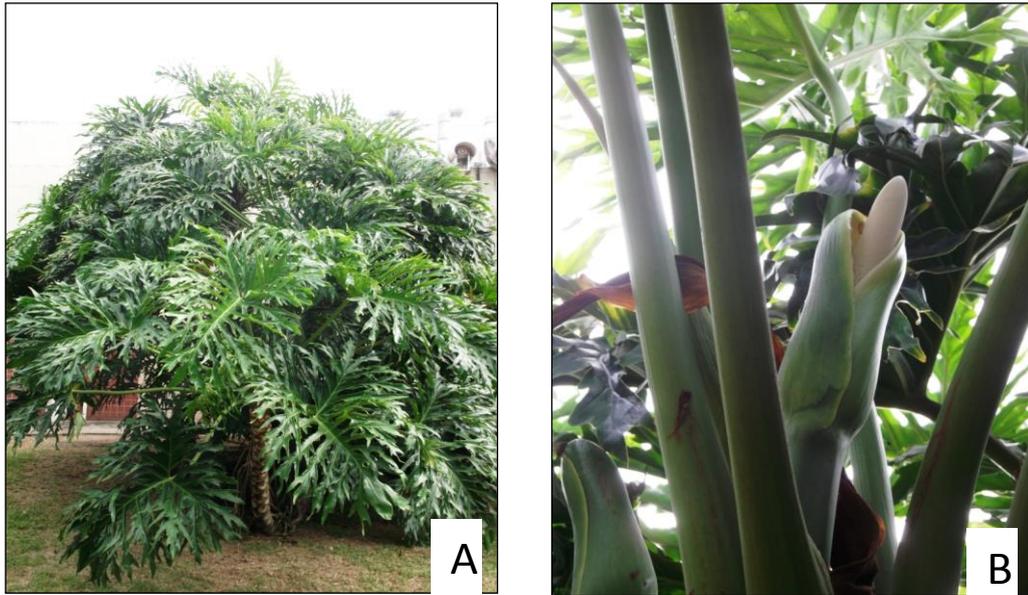
interna da espata apresenta o terço apical com coloração rosada ou amarelada; o terço basal tem cor vermelho intensa (Maia et al., 2010).



**Figura 1.9:** . A: *Philodendron acutatum* (Araceae) (Foto: CATE Araceae, 2014), B: inflorescência de *P. acutatum* (Foto: A.C.D. Maia)

#### 1.5.1.3 *Philodendron mello-barretoanum* R. Burle-Marx ex G.M. Barroso (Philodendreae)

*Philodendron mello-barretoanum* é uma espécie terrestre hemiepífita ou arbusto epilítico (Figura 1.10, A e B). Esta espécie está distribuída desde o estado do Tocantins até a Bolívia, ocorrendo nas áreas de transição entre o Cerrado e a floresta Amazônica. Está presente também fora de sua área nativa de distribuição como planta ornamental em jardins e parques. As folhas têm lâmina foliar do tipo bipinatilobadas, são grandes com 60- 72 x 50- 56 cm e com longos pecíolos. As inflorescências são normalmente solitárias, com uma espata com 16 a 18 cm de comprimento de coloração externa verde e com interior branco. A espádice é coberta por flores unissexuadas, com o terço apical sendo ocupado pelas flores masculinas férteis (de 4,5 a 5 cm de comprimento), seguida por uma região contendo flores masculinas estéreis. As flores femininas são encontradas no terço basal (CATE Araceae, 2014).



**Figura 1.10:** A: *Philodendron mello-barretoanum* (Araceae) (Foto: G.K.N. Santos), B: inflorescência de *P. mello-barretoanum* no primeiro dia da antese (Foto: G.K.N. Santos).

#### 1.5.1.4 *Taccarum ulei* Eng. & K. Krause (Araceae, Spathicarpeae)

*Taccarum ulei* é uma planta geófita rizomatosa adaptada a uma grande variedade de solos e condições de luminosidade (Figura 1.11, A e B). É encontrada no Nordeste brasileiro, onde coloniza desde áreas de floresta de tabuleiro até a Caatinga. As folhas desta espécie são do tipo bipinatífida, solitárias e eretas, emergindo do solo e podendo alcançar uma altura de 150 cm. As inflorescências de *T. ulei* são solitárias e possuem espata em forma de funil com 13 a 22 cm de comprimento, coloração amarronzada e consistência cartácea. A espádice porta flores unissexuais masculinas e femininas que ocupam zonas distintas em seu eixo vertical. As flores femininas ocupam o terço basal da espádice, apresentam coloração amarelada e são circundadas por 4 ou 5 estaminódios de coloração leitosa. Os dois terços superiores da espádice são ocupados pelas flores masculinas, que são caracterizadas pela presença de conectivos bem desenvolvidos em forma de botões de cor rósea intensa, circundada por anteras de tonalidade amarelo-viva. Em inflorescências maduras a espádice é mais longa que a espata (entre 14 e 23 cm de comprimento) (Maia e Schlindwein, 2006).



**Figura 1.11:** A *Taccarum ulei* (Araceae) (Foto: G.K.N. Santos) B: Inflorescência de *T. ulei* no primeiro dia da antese (Foto: G.K.N. Santos)

## 1.5.2 Besouros

### 1.5.2.1 Classificação (adaptada de Bouchard et al (2011))

Ordem Coleoptera

Subordem Polyphaga

Superfamília Scarabaeoidea Latreille, 1802

Família Melolonthidae Leach, 1819

Subfamília Dynastinae Macleay, 1819

Tribo Cyclocephalini Laporte, 1840

Gênero *Cyclocephala* Dejean, 1821

*Cyclocephala cearae* Höhne, 1923 (Figura 1.12)

*Cyclocephala celata* Dechambre, 1980 (Figura 1.13 A e B)

*Cyclocephala forsteri* Endrodi, 1963 (Figura 1.14)

Gênero *Erioscelis* Burmeister, 1847

*Erioscelis emarginata* Mannerheim, 1829 (Figura 1.15)



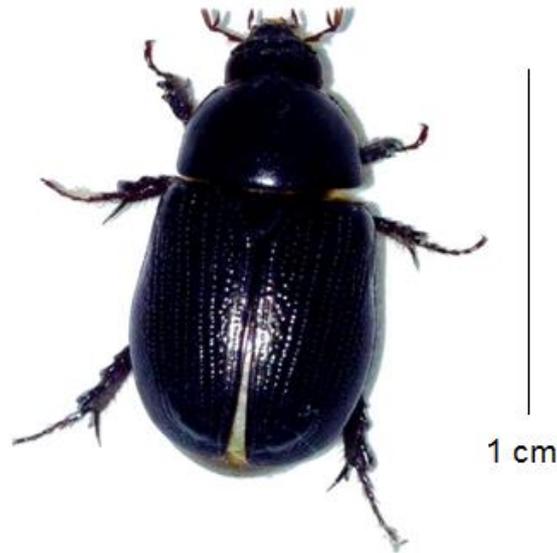
**Figura 1.12:** *Cyclocephala cearae* macho (Fotos: G.K.N. Santos)



**Figura 1.13:** *Cyclocephala celata* macho (A) e *C. celata* fêmea (B) (Fotos: G.K.N. Santos)



**Figura 1.14:** *Cyclocephala forsteri* fêmea. (Reproduzido de: Endrödi, S., 1963. Neue Cyclocephala-Arten. Annales historico-naturales Musei nationalis hungarici. Budapest 55:323-333.)



**Figura 1.15:** *Erioscelis emarginata* (sexo indeterminado) (Foto: G.K.N. Santos)

#### 1.5.2.2 *Cyclocephala* Dejean, 1821

Engloba mais de 350 espécies com distribuição predominantemente neotropical. Besouros do gênero *Cyclocephala* apresentam hábito crepuscular ou noturno. Adultos de algumas espécies alimentam-se de pólen, tecidos florais nutritivos e exudados florais de suas plantas hospedeiras. Os ovos são depositados pelas fêmeas no solo úmido. As larvas se desenvolvem neste ambiente, alimentando-se do folhíço e matéria orgânica em decomposição e promovendo a reciclagem de nutrientes no solo de florestas. Larvas de algumas espécies podem se alimentar de raízes de plantas, podendo se tornar pragas na agricultura. As larvas passam por três instares larvais e, ao final do terceiro instar, constroem câmaras pupais, onde se aloja a pupa. Em *C. celata*, os imagos emergem 38 dias após a formação da pupa e o ciclo de vida completo nesta espécie leva 164 dias (de Souza et al., 2014). Alguns caracteres diagnósticos para este gênero, segundo a chave para gêneros de Cyclocephalini de Jameson et al. (2002), são: protarso nos machos com garras e tarsômeros alargados; pró-pigídio sem a presença de cerdas longas e densas; clípeo com ápice arredondado ou emarginado (Figura 1.16); mandíbulas estreitas, distintamente mais longas do que largas; maxilas contendo dentes distintos; élitros lisos ou distintamente pontuados, mas sem coloração metálica.



**Figura 1.16:** Representação de clípeo com ápice arredondado (a) e emarginado (b) em *Cyclocephala*. (Adaptado de: Jameson et al, 2002)

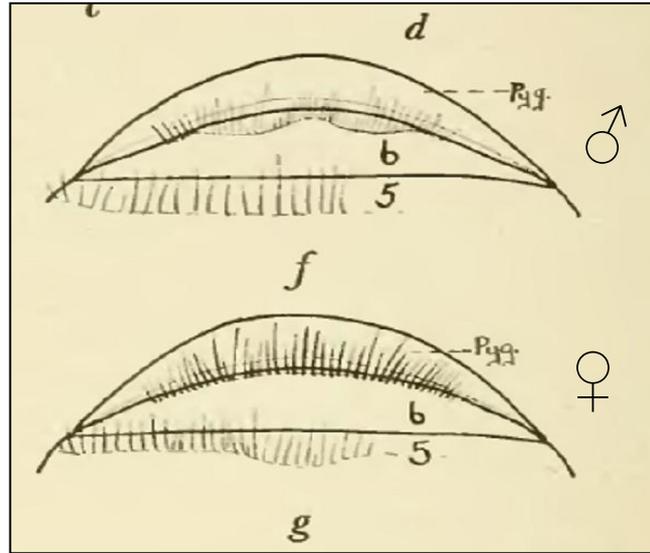
#### 1.5.2.3 *Erioscelis* Burmeister, 1847

O gênero *Erioscelis* é representado por cinco espécies encontradas na América Central e América do Sul. Os caracteres morfológicos deste gênero se assemelham aos encontrados nas espécies de *Cyclocephala*. Alguns caracteres morfológicos que podem ser usados para distinguir os dois gêneros são ausência de garras alargadas nos machos deste gênero; clípeo reto ou quase reto, não refletido apicalmente e trapezoidal; ápice truncado e variando de não-emarginado a emarginado pouco profundo (Figura 1.17) (Jameson et al., 2002; Saylor, 1946).



**Figura 1.17:** Representação de clípeo com ápice truncado (a) e emarginado (b) em *Erioscelis*. (Adaptado de: Jameson et al, 2002)

A diferenciação entre machos e fêmeas deste gênero pode ser observada com base no formato do esternito apical (Figura 1.18) (Saylor, 1946). De acordo com a análise filogenética realizada por (Clark, 2011), *Erioscelis* é um gênero irmão de *Cyclocephalini*, mas não pertence a este clado.



**Figura 1.18:** Esternito apical de *Erioscelis emarginata* (Adaptado de: Saylor, 1946)

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o perfil de hidrocarbonetos cuticulares em espécies de besouros antófilos da tribo Cyclocephalini (Coleoptera; Melolonthidae; Dynastinae) e elucidar os semioquímicos envolvidos na interação destes besouros com plantas da família Araceae.

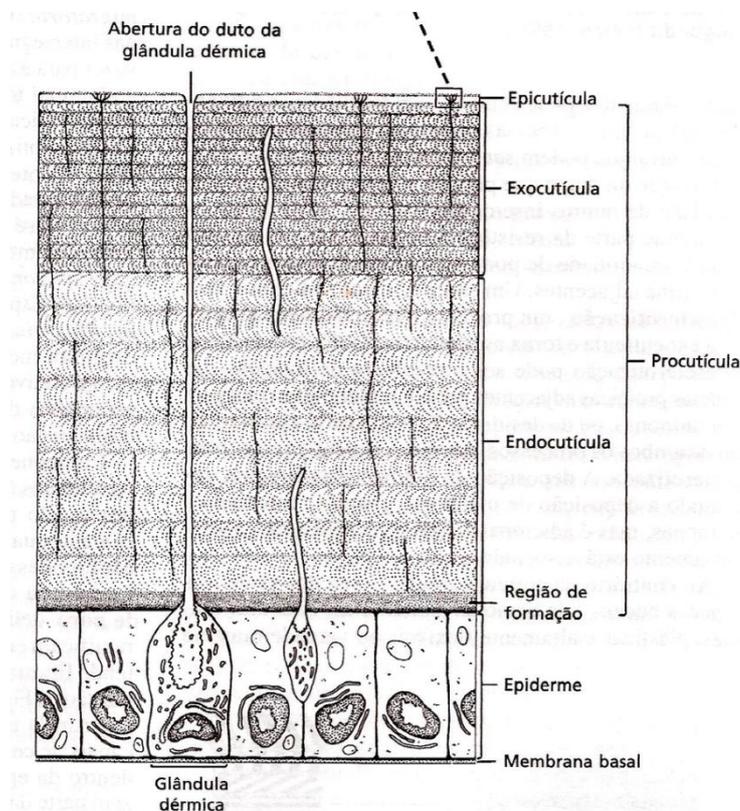
### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o perfil de hidrocarbonetos cuticulares em três espécies de besouros da tribo Cyclocephalini: *Cyclocephala celata*, *C. cearae* e *Erioscelis emarginata*;
- Elucidar quais os sinomônios envolvidos na comunicação química entre o besouro antófilo *Cyclocephala celata* (Coleoptera; Melolonthidae; Dynastinae; Cyclocephalini) e sua planta hospedeira *Philodendron acutatum* (Araceae) por meio de testes eletrofisiológicos e comportamentais;
- Elucidar quais os sinomônios envolvidos na comunicação química entre o besouro antófilo *C. cearae* (Coleoptera; Melolonthidae; Dynastinae; Cyclocephalini) e sua planta hospedeira *Taccarum ulei* (Araceae) por meio de testes eletrofisiológicos e comportamentais;
- Estudar por meio de ensaios eletrofisiológicos as respostas das antenas de besouros das espécies *C. forsteri*, *C. cearae*, *C. celata* e *E. emarginata* a voláteis orgânicos florais de estrutura química incomum presentes em plantas cantarófilas.

### 3 COMPOSIÇÃO TÁXON-ESPECÍFICA NO PERFIL DE HIDROCARBONETOS CUTICULARES DE *CYCLOCEPHALA CEARAE*, *C. CELATA* E *ERIOSCELIS EMARGINATA* (MELOLONTHIDAE, CYCLOCEPHALINI)

#### 3.1 INTRODUÇÃO

O sucesso evolutivo dos insetos no ambiente terrestre está relacionado à capacidade de conservar água. Um dos fatores que contribuem para este sucesso é a presença de uma cutícula que protege o animal contra a dessecação. A cutícula dos insetos é uma estrutura composta por várias camadas (Figura 3.1) e a principal barreira contra perda de água é a camada lipídica associada à epicutícula (Hadley, 1980). A superfície da epicutícula é recoberta por uma mistura de lipídeos, que pode conter hidrocarbonetos saturados ou insaturados de cadeia normal ou ramificada, ácidos graxos livres, aldeídos, alcoóis, ésteres, cetonas, glicerídeos e esteróis.



**Figura 3.1:** Estrutura geral da cutícula dos insetos (Reproduzida de: Gullan e Cranston, 2008).

Entre os lipídeos cuticulares, os hidrocarbonetos merecem especial atenção, pois frequentemente estão presentes em alta concentração e desempenham funções importantes na comunicação intraespecífica e interespecífica nos insetos (Howard e Blomquist, 2005; Lockey, 1991; Singer, 1998). Os hidrocarbonetos nos insetos estão presentes como uma mistura complexa de moléculas, frequentemente característica de cada espécie (Howard e Blomquist, 2005). Dentro de uma mesma espécie, a composição dos hidrocarbonetos cuticulares pode variar entre machos e fêmeas e em relação às diferentes fases do ciclo de vida (Howard e Blomquist, 2005; Lockey, 1991; Thomas e Simmons, 2008). Outros fatores como tipo de dieta do inseto (Liang e Silverman, 2000), estágio reprodutivo (Scott et al., 2008), diferentes populações de uma mesma espécie (Hirai et al., 2008), diferentes colônias de insetos sociais (Dahbi et al., 1996; Jutsum et al., 1979; Morel et al., 1988) bem como diferentes castas em uma mesma colônia (Greene e Gordon, 2003; Wagner et al., 1998) podem alterar os compostos ou a proporção em que eles se encontram na cutícula.

Em relação à estrutura, os hidrocarbonetos cuticulares apresentam cadeia carbônica com 11 a 43 átomos, com presença de cadeias com números pares e ímpares de átomos de carbono. Eles estão distribuídos em três classes principais: n-alcenos, oleofinas (hidrocarbonetos insaturados) e metil-alcenos. As oleofinas e os metil-alcenos normalmente ocorrem como misturas isoméricas (Lockey, 1991). As oleofinas mais comuns em insetos são os alcenos com apenas uma insaturação na molécula. Podem também estar presentes hidrocarbonetos com duas ou, menos frequentemente, mais insaturações. A posição das duplas ligações na cadeia carbônica pode ser determinada por meio da derivatização dos compostos insaturados seguida de análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (Lockey, 1988)

Os hidrocarbonetos cuticulares de insetos podem ser extraídos por diversas técnicas. O método mais comum é a extração com um solvente orgânico (geralmente pentano, hexano ou clorofórmio) através da lavagem da cutícula ou imersão do inseto em solvente por um determinado período de tempo, normalmente de 1 a 10 minutos (Blomquist e Bagnères, 2010). Outras técnicas incluem o uso de micro-extração em fase sólida (SPME) (Ferreira-Caliman et al., 2014; Turillazzi et al., 1998) ou de sílica-gel para extrair os hidrocarbonetos (Choe et al., 2012).

Devido à especificidade dos hidrocarbonetos cuticulares eles podem ser usados como uma ferramenta taxonômica auxiliando na identificação de espécies juntamente com outros métodos de identificação mais convencionais, como caracteres morfológicos e biologia molecular. Os benefícios do uso dos hidrocarbonetos como ferramenta taxonômica são mais

expressivos na identificação de espécies crípticas e de sinais iniciais de isolamento reprodutivo em populações (Kather e Martin, 2012).

Não há ainda na literatura dados sobre a composição dos hidrocarbonetos cuticulares em besouros da tribo Cyclocephalini. O perfil químico das cutículas pode ser usado como uma ferramenta complementar na taxonomia deste grupo, sobretudo no gênero *Cyclocephala*, o mais diversificado da tribo ( $\geq 350$  espécies). Muitas espécies de *Cyclocephala* apresentam polimorfismo e há a ocorrência de espécies crípticas (espécies classificadas como uma única espécie por serem superficialmente indistinguíveis) dentro do gênero. A taxonomia em *Cyclocephala* é baseada principalmente em caracteres da genitália masculina dos besouros, o que requer cuidadosa dissecação, montagem e análises das estruturas anatômicas, tornando a classificação difícil e até impossível se apenas as fêmeas estiverem disponíveis (Ratcliffe, 2008; Ratcliffe e Cave, 2009; Ratcliffe e Hoffman, 2011).

Assim sendo, neste trabalho foi investigado pela primeira vez o perfil de hidrocarbonetos cuticulares em três espécies de besouros da tribo Cyclocephalini, com o objetivo de investigar as possíveis diferenças na composição química entre esses táxons e entre machos e fêmeas de cada espécie. Duas técnicas de extração foram testadas para escolha da técnica mais adequada ao estudo dos hidrocarbonetos cuticulares em Cyclocephalini.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 Preparação dos extratos de cutículas de Cyclocephalini em hexano

Foram preparados extratos cuticulares de machos e fêmeas de besouros coletados em campo: *Cyclocephala cearae*, *C. celata*, e *Erioscelis emarginata*. Indivíduos das duas espécies de *Cyclocephala* foram coletados em áreas de floresta nativa pertencentes à região da Zona da Mata Norte do estado de Pernambuco, dentro do domínio da Floresta Atlântica Nordeste. Machos e fêmeas adultos de *C. celata* foram coletados manualmente no interior de inflorescências de *Philodendron acutatum* (Araceae) em um fragmento de Floresta Atlântica localizado no município de Igarassu (7°45'S; 35°02'W). Indivíduos de *C. cearae* foram coletados dentro de inflorescências de *Taccarum ulei* (Araceae) em uma área de mata às margens de um trecho da rodovia BR101 Norte, que conecta os municípios de Abreu e Lima e Igarassu, localizada a cerca de 10 km da primeira área de coleta (7°73'S; 34°95'W).

Machos e fêmeas adultos de *E. emarginata* foram coletados manualmente em inflorescências de *Philodendron mello-barretoanum* localizadas no Horto Botânico da

Universidade Católica de Brasília, Taguatinga – DF (15°86' S; 48°03'). A área de coleta faz parte do domínio do Cerrado.

Após a coleta, os besouros foram levados ao laboratório e mantidos em recipientes de plástico semitransparente (30 cm de comprimento, 21 cm de altura e 21 cm de largura), contendo terra vegetal (Terra Jupinay, produzida pela Granja Jupinay, Glória de Goitá-PE) peneirada e umedecida. Os terrários permaneceram no insetário do Laboratório de Ecologia Química, com temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuridão. Os besouros foram alimentados com pedaços de maçã.

Para preparação dos extratos cuticulares, machos e fêmeas de cada espécie foram retirados do terrário com uma pinça, colocados individualmente em frascos de vidro silanizado e refrigerados a uma temperatura de  $-5^\circ\text{C}$  por 60 min. Após este tempo, cada besouro foi lavado com água destilada para retirar grãos de terra e alimento aderidos à superfície da cutícula. Os besouros foram então colocados sobre papel absorvente para retirar o excesso de água e, em seguida, receberam um jato de  $\text{N}_2$  para secagem. Uma vez secos, cada indivíduo foi colocado em um frasco contendo 1mL de n-hexano bidestilado, grau GC. O frasco foi agitado manualmente por 1 min. Terminado o tempo de extração, a solução foi retirada com uma pipeta de Pasteur e transferida para um frasco com capacidade para 1,5 mL. O procedimento de limpeza e extração foi repetido para cada indivíduo separadamente. Foram extraídos os hidrocarbonetos cuticulares de 15 machos e 15 fêmeas de cada espécie. Os frascos contendo extratos cuticulares foram mantidos sobre refrigeração (a  $-5^\circ\text{C}$ ) até a realização das análises por CG-EM.

### **3.2.2 Preparação dos extratos de cutículas de *Cyclocephala cearae* com sílica-gel**

Extratos cuticulares de dez besouros da espécie *C. cearae* (cinco machos e cinco fêmeas) foram preparados utilizando a técnica descrita por Choe et al (2012). A sílica-gel (sílica-gel 60 0,063-0,2 mm/70-230 mesh ASTM, Macherey-Nagel) foi previamente lavada com hexano bidestilado e seca sob fluxo de nitrogênio até que os grãos de sílica se movessem livremente. Em seguida 1g de sílica foi pesado em um frasco com capacidade para 5 mL no qual foi colocado um besouro (limpo e seco conforme descrito no item anterior). O frasco foi então agitado em Vortex por 30 s em potência máxima. Após a agitação, o besouro foi retirado cuidadosamente do frasco com uma pinça limpa e a sílica colocada em uma pipeta de Pasteur contendo na base da ponta um chumaço de algodão previamente lavado com hexano. A sílica

dentro da pipeta foi então lavada com 1 mL de hexano e o extrato coletado em um vial com capacidade para 1,5 mL. O procedimento foi repetido para cada besouro individualmente.

### 3.2.3 Análise dos extratos cuticulares

Os extratos foram analisados em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo Agilent 5975C Series (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) equipado com coluna apolar HP-5 (Agilent J&W, 60 m × 0.25 mm diâmetro interno; espessura do filme 0.25 µm). As amostras foram analisadas sob as seguintes condições (adaptadas a partir da metodologia de Fombong et al, 2012): temperatura inicial de 60°C (mantida por 1 min), velocidade de aquecimento de 15°C/min e temperatura final de 260°C, que foi mantida por 20 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hélio, a fluxo constante de 1mL por minuto e a temperatura do injetor foi mantida a 250°C. Os compostos eluídos da coluna cromatográfica foram ionizados por impacto de elétrons a 70 eV. A fonte de ionização foi mantida a 230° C e o quadrupolo a 150°C. Os espectros de massa foram obtidos no modo *scan* com velocidade de 0,5 scan por segundo, com faixa de varredura de  $m/z$  de 35 a 550.

Uma alíquota de 1µL de cada extrato foi injetada em modo *splitless*. Os compostos foram identificados por meio da análise dos espectros de massas de cada pico cromatográfico, comparação com padrões autênticos e cálculo de índices de retenção. Foram calculados os índices de retenção linear dos componentes dos extratos cuticulares utilizando-se os tempos de retenção de cada composto e os tempos de retenção de n-alcenos (C 9 a C 36) analisados sob as mesmas condições. Os valores calculados foram comparados com os índices de retenção publicados na literatura (Adams, 2007; NIST WebBook, 2014).

### 3.3 RESULTADOS

#### **3.3.1 Perfil de hidrocarbonetos em *Cyclocephala cearae*, *C. celata* e *Erioscelis emarginata* extraídos com hexano**

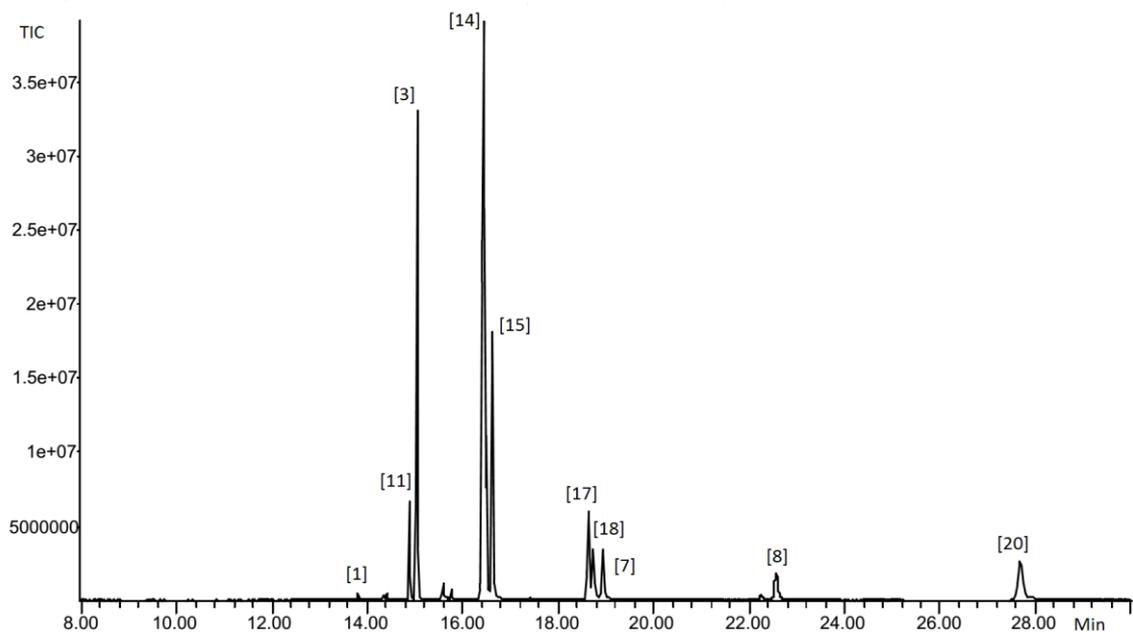
Os hidrocarbonetos cuticulares em três espécies de Cyclocephalini foram estudados por meio da análise em CG-EM dos extratos hexânicos. A análise destes extratos, descrita na Tabela 3.1, mostra que a imersão dos insetos em hexano por 1 min permitiu a extração dos hidrocarbonetos cuticulares com pouca interferência de outras classes de lipídeos, eliminando a necessidade de realização de coluna cromatográfica para purificar as frações lipídicas. Nos extratos analisados, foram encontrados hidrocarbonetos saturados e insaturados com cadeia de 21 a 31 átomos de carbono, além de dois ésteres de cadeia longa: hexadecanoato de n-butila e octadecanoato de n-butila. Nas três espécies estudadas houve predomínio de hidrocarbonetos alifáticos com número ímpar de carbonos, principalmente alcanos e alcenos monoinsaturados. Não foram encontrados hidrocarbonetos ramificados.

**Tabela 3.1** Perfil dos lipídeos cuticulares em três espécies de Cyclocephalini: *Cyclocephala cearae*, *C. celata* e *Erioscelis emarginata* amostrados por imersão em hexano por um 1min.

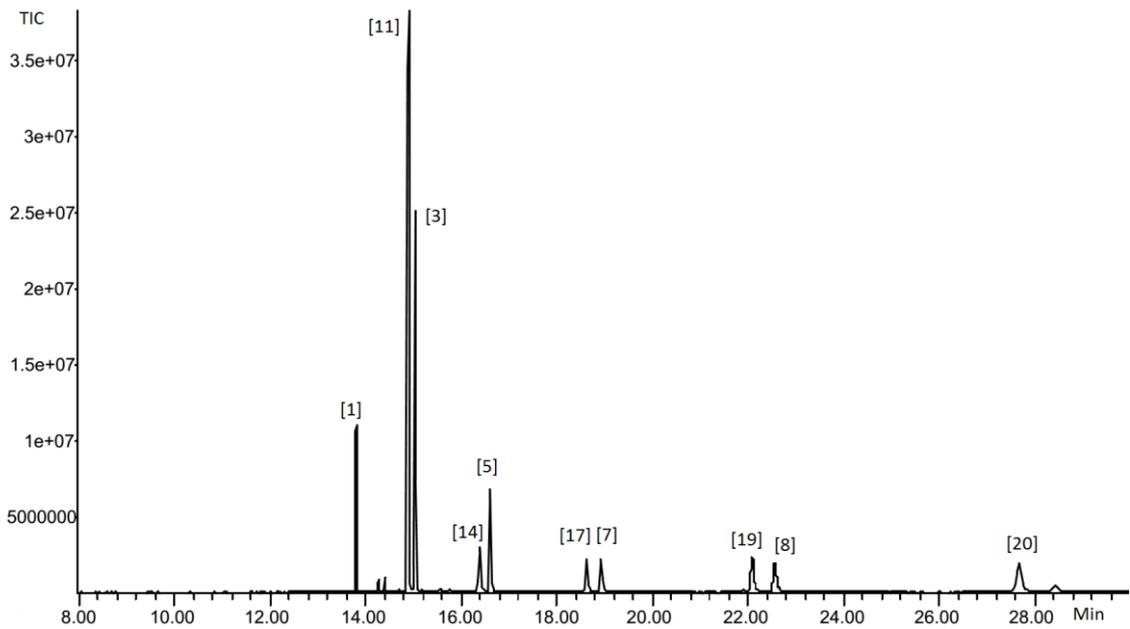
N°	Compostos	IR calc	IR lit	% área ± DP					
				<i>Cyclocephala cearae</i>		<i>Cyclocephala celata</i>		<i>Erioscelis emarginata</i>	
				Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
<b>Alcanos</b>									
1	n-Heneicosano (C21)	2101	2100	0,16 ± 0,05	0,2 ± 0,14	5,2 ± 0,44	6,68 ± 2,08	0	0
2	n-Docosano (C22)	2201	2200	0,09 ± 0,09	0,13 ± 0,12	0,44 ± 0,04	0,5 ± 0,11	0	0
3	n-Tricosano (C23)	2301	2300	13,7 ± 2,82	16,13 ± 4,24	19,75 ± 0,72	23,67 ± 5,24	4,84 ± 1,39	6,00 ± 1,82
4	n-Tetracosano (C24)	2401	2400	0,36 ± 0,1	0,38 ± 0,07	0	0	0,17*	0,35 ± 0,36
5	n-Pentacosano (C25)	2501	2500	11,28 ± 1,85	12,77 ±1,36	6,414 ± 2,11	9,23 ± 4,64	15,63 ± 6,53	26,08 ± 7,36
6	Hexacosano (C26)	2601	2600	0,07 ± 0,1	0	0	0	0	0
7	n-Heptacosano (C27)	2693	2700	6,8 ± 1,11	6,65 ± 2,96	4,37 ± 1,64	4,84 ± 3,08	<b>45,64 ±</b> <b>4,66</b>	<b>45,82 ±</b> <b>7,77</b>
8	n-Nonacosano (C29)	2890	2900	5,24 ± 2,06	4,31 ± 1,85	3,6 ± 1,93	6,74 ± 5,51	5,01 ± 2,89	4,79 ± 2,77
9	n- Hentriacontano (C31)	3095	3100	0,55 ± 0,78	0	0	0,88 ± 0,86	0	0
<b>Alcenos</b>									
10	C22:1	2178		0	0	0,44 ± 0,08	0,42 ± 0,26	0	0
11	C23:1	2278		1,56 ± 0,78	1,56 ± 0,84	<b>44,86 ±</b> <b>5,81</b>	<b>31,08 ±</b> <b>11,7</b>	0	0
12	C24:1	2377		0,33 ± 0,22	0,3 ± 0,27	0	0	0	0
13	C24:1	2385		0,2 ± 0,13	0	0	0	0	0
14	C25:1	2478		<b>29,12 ±</b> <b>2,69</b>	<b>31,77 ±</b> <b>2,4</b>	5,53 ± 0,97	3,23 ± 1,57	0	0
15	C25:1	2488		13,2 ± 3,15	8,9 ± 1,35	0	0	0	0
16	C27:1	2633		0	0	0	0	1,03 ± 0,69	0,56 ± 0,97
17	C27:1	2669		6,04 ± 0,73	6,25 ± 0,98	2,97 ± 1,00	1,67 ± 1,46	0	0
18	C27:1	2676		4,32 ± 0,94	3,76 ± 0,97	0	0	0	0
19	C29:1	2875		0,52 ± 0,52	0,35 ± 0,33	4,78 ± 2,95	2,65 ± 2,35	5,30 ± 2,95	1,84 ± 1,78
20	C31:1	3069		5,76 ± 2,73	5,31 ± 0,98	3,29* 2,82	3,55 ± 2,82	19,9 ± 5,87	12,81 ± 7,09
<b>Ésteres</b>									
21	hexadecanoato de n-butila	2186	2188	0,14 ± 0,09	0,61 ± 0,42	0	0	0,23 ± 0,35	0,18 ± 0,21
22	octadecanoato de n-butila	2392	2388	0	0,15 ± 0,22	0	0	0	0

\*Encontrado em apenas um extrato

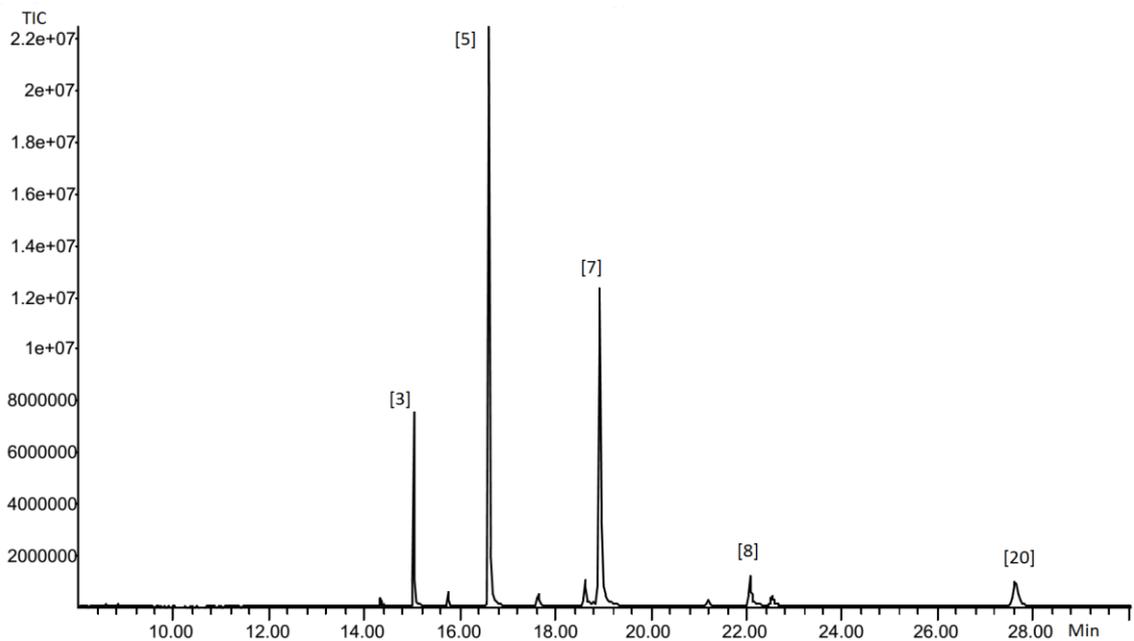
A composição dos hidrocarbonetos foi diferente nas três espécies. Em *C. cearae*, dois alcenos monoinsaturados com 25 átomos de carbono são os compostos majoritários, seguidos pelos alcanos n-tricosano (C 23) e n-pentacosano (C 25) (Figura 3.2). Em *C. celata* o hidrocarboneto predominante é um alceno monoinsaturado com 23 átomos de carbono, que chega a representar mais de 40 % da abundância relativa de compostos presentes no extrato de fêmeas desta espécie. Os alcanos n-tricosano e n-pentacosano são o segundo e terceiro compostos majoritários nos extratos cuticulares nesta espécie, respectivamente (Figura 3.3). Em indivíduos de *E. emarginata* são encontrados hidrocarbonetos com peso molecular relativamente maior, sendo o composto majoritário o alceno n-heptacosano (C 27), que representa mais de 45% da composição dos hidrocarbonetos cuticulares. Nesta espécie também são bastante representativos um alceno monoinsaturado com 31 átomos de carbono e o alceno n-pentacosano (Figura 3.4).



**Figura 3.2** Perfil cromatográfico de hidrocarbonetos cuticulares em *Cyclocephala cearae* amostrados por imersão dos insetos em hexano por 1min. Os números referem-se aos compostos listados na tabela 3.1.



**Figura 3.3** Perfil cromatográfico de hidrocarbonetos cuticulares em *Cyclocephala celata* amostrados por imersão dos insetos em hexano por 1min. Os números referem-se aos compostos listados na tabela 3.1.

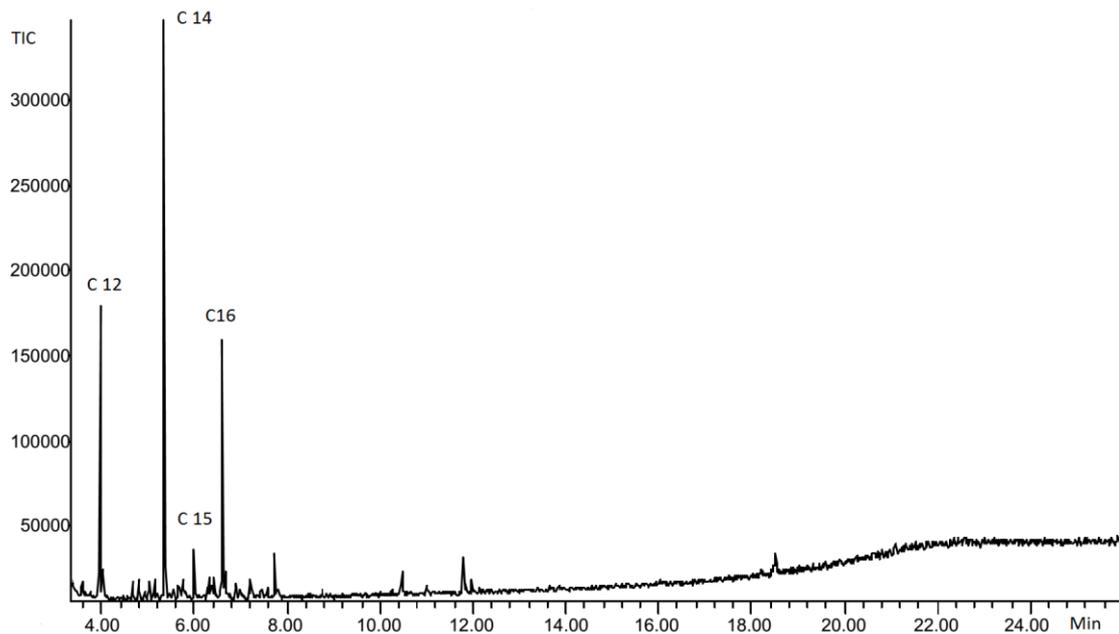


**Figura 3.4** Perfil cromatográfico de hidrocarbonetos cuticulares em *Erioscelis emarginata* amostrados por imersão dos insetos em hexano por 1min. Os números referem-se aos compostos listados na tabela 3.1.

Diferenças entre a composição de machos e fêmeas de uma mesma espécie são mais sutis e limitam-se a mudanças nas proporções relativas dos compostos. Alguns compostos minoritários foram encontrados em apenas um dos sexos, como n-hentriacontano (C 31), presente em fêmeas de *C. cearae* e em machos de *C. celata*.

### 3.3.2 Extração de hidrocarbonetos cuticulares com sílica-gel

Foram analisados extratos cuticulares de dois machos e de duas fêmeas de *C. cearae* obtidos pela técnica de extração com sílica-gel. Os extratos analisados apresentaram concentração de compostos bem abaixo da observada nos extratos obtidos por imersão do inseto em hexano. Nesses extratos foram encontrados predominantemente alcanos de cadeia mais curta que os amostrados pela imersão em hexano, sendo os mais expressivos n-tetradecano (C 14), n-dodecano (C 12), n-hexadecano (C 16) e n-pentadecano (C 15), nesta ordem (Figura 3.5).



**Figura 3.5:** Perfil cromatográfico de extrato de cuticular de *Cyclocephala cearae* macho obtido por extração com sílica-gel.

### 3.4 DISCUSSÃO

A composição dos lipídeos cuticulares pode variar de acordo com a técnica de extração utilizada. Tempos de imersão em solvente mais longos que 10 minutos, por exemplo, podem resultar na extração de lipídeos internos em adição aos lipídeos cuticulares (Drijfhout, 2009). A extração de hidrocarbonetos cuticulares com sílica-gel permite uma extração mais seletiva dos hidrocarbonetos presentes na epícutícula e foi aplicada com sucesso em formigas e abelhas (Choe et al, 2012). A técnica descrita por Choe et al. (2012) quando aplicada aos besouros *C. cearae* resultou em extratos cuticulares bastante diluídos em relação aos obtidos por imersão do inseto em hexano. Adicionalmente, esta técnica requer mais tempo, gasto de material (solvente, sílica, vidrarias) e uso de equipamentos do que a lavagem com solvente. Desta forma a lavagem dos insetos em hexano foi escolhida como técnica mais adequada para a preparação dos extratos cuticulares de Cyclocephalini.

Na análise dos extratos cuticulares foi possível verificar diferenças na composição química das três espécies de Cyclocephalini estudadas. Misturas de hidrocarbonetos são frequentemente complexas de modo que elas têm muitas características qualitativas e quantitativas, que as tornam potencialmente discriminatórias. Em particular, a composição de misturas de olefinas e metil-alcanos isoméricos provou ser taxonomicamente valiosa em estudos (Lockey, 1988). Martin e Drijfhout (2009) compararam os perfis de hidrocarbonetos cuticulares de 78 espécies de formigas pertencentes a 5 subfamílias e encontraram quase 1.000 hidrocarbonetos descritos pertencentes a 187 séries homólogas distintas. O estudo da composição dos hidrocarbonetos de várias espécies pertencentes a um mesmo táxon pode fornecer ainda informações sobre a irradiação evolutiva de um grupo, como demonstrado por Kather e Martin (2015), que revisaram o perfil de hidrocarbonetos cuticulares em 241 espécies da ordem Hymenoptera.

Os hidrocarbonetos cuticulares estão comumente envolvidos no reconhecimento de indivíduos co-específicos e na sinalização de *status* reprodutivo (Blomquist e Bagnères, 2010; Howard e Blomquist, 2005). Os hidrocarbonetos cuticulares também desempenham uma função importante no reconhecimento de gênero em muitas espécies. São conhecidos exemplos em que machos ou fêmeas contêm hidrocarbonetos distintivos não produzidos pelo outro gênero, como em *Xylotrechus colonus* F. (Cerambycidae) e em nas espécies simpátricas *Altica cirsicola*, *A. fragariae* e *A. viridicyanea* (Chrysomelidae) (Xue et al., 2016). Em outros casos, os mesmos hidrocarbonetos estão presentes, mas em abundâncias relativas específicas para cada gênero, como documentado para *Drosophila virilis* (Jackson e Bartelt, 1986). Contudo,

são também conhecidos exemplos em que ambos os sexos têm os mesmos hidrocarbonetos e parecem ter as mesmas abundâncias relativas de todos os componentes, como ocorre no ectoparasitóide *Cephalonomia waterstoni* (Hymenoptera, Bethyridae (Howard, 1992). Considerando-se a importância do reconhecimento químico nos insetos, pode-se afirmar que os sinais químicos frequentemente fundamentam o isolamento sexual entre espécies de insetos (Peterson et al., 2007) e que eventos recentes de especiação e isolamento reprodutivo podem ser observáveis no perfil de hidrocarbonetos cuticulares (Choe et al., 2012).

O perfil dos hidrocarbonetos cuticulares pode ser utilizado como uma ferramenta taxonômica auxiliando na identificação de espécies. Uma vez que os ecologistas químicos tenham estabelecido as principais diferenças no perfil de hidrocarbonetos de duas espécies, esses dados podem ser usados por taxonomistas para auxiliar a identificação de espécies. Esses dados são particularmente relevantes para discriminar grupos de espécies crípticas, que apresentam poucos caracteres morfológicos distintos ou cuja identificação é baseada em apenas uma casta de insetos (Blomquist e Bagnères, 2010; Kather e Martin, 2012). Um exemplo é o trabalho de Guillem et al. (2012), que descobriu que duas espécies de formiga do gênero *Myrmica*, cuja identificação taxonômica é difícil até mesmo para mirmecologistas treinados, podem ser distinguidas com base na presença ou ausência de dois hidrocarbonetos cuticulares: 5-metil-pentacosano em *M. sabuleti* e 3-metil-tricosano em *M. scabrinodis*. A extração de hidrocarbonetos cuticulares também pode ser realizada para espécimes de coleções entomológicas utilizando solvente ou fibras de SPME, já que os espécimes podem ser retornados às coleções após a extração. Tem sido demonstrado que os hidrocarbonetos cuticulares podem permanecer estáveis mesmo para espécimes armazenados durante décadas em condições relativamente constantes e isto também é válido para os hidrocarbonetos insaturados mais instáveis (Martin et al., 2009). Tal observação pode vir a ser particularmente útil na identificação de complexos de espécies de *Cyclocephala* de difícil diferenciação taxonômica e distribuição geográfica semelhante, entre as quais podemos destacar *C. simulatrix*, *C. colasi*, *C. atricapilla*, *C. celata*; *C. latericia*, *C. ohausiana* e *C. cearae*; *C. distincta*, *C. amazona*.

### 3.5 CONCLUSÕES

Foram testadas neste trabalho duas técnicas para extração de hidrocarbonetos cuticulares. A extração dos hidrocarbonetos por imersão do inseto em hexano se mostrou mais adequada por ser mais simples e fornecer extratos mais concentrados com maior número de componentes. Análises dos extratos de hidrocarbonetos cuticulares mostraram que há uma clara diferença na composição das três espécies estudadas, com predominância de dois alcenos monoinsaturados com 25 átomos de carbono e dos alcanos n-tricosano (C 23) e n-pentacosano (C 25) em *Cyclocephala cearae*; de um alceno monoinsaturado com 23 átomos de carbono em *C. celata* e de n-heptacosano (C 27) seguido de um alceno monoinsaturado com 31 átomos de carbono e do alcano n-pentacosano em *Erioscelis emarginata*.

## **4 RESPOSTA ELETROFISIOLÓGICA E COMPORTAMENTAL DE *CYCLOCEPHALA CELATA* (MELOLONTHIDAE; DYNASTINAE; CYCLOCEPHALINI) AO ODOR FLORAL DE *PHILODENDRON ACUTATUM* (ARACEAE) E A EXTRATOS CUTICULARES CO-ESPECÍFICOS**

### **4.1 INTRODUÇÃO**

Araceae Juss. é uma família pertencente ao grupo das plantas monocotiledôneas que apresenta mais de 3.300 espécies distribuídas em 117 gêneros com distribuição predominantemente neotropical (The Plant List, 2013). As aráceas apresentam uma grande diversidade de formas de vida, podendo ser epífitas, hemi-epífitas, terrestres, aquáticas flutuantes ou submersas, geófitas e trepadeiras (Mayo et al., 1997). Uma das características marcantes da família são as inflorescências compostas por uma espata solitária que envolve uma espádice com flores bissexuadas ou unissexuadas (às vezes com presença de uma região estéril) (Thomas et al., 1998).

As inflorescências em Araceae são protogínicas, apresentando uma divisão temporal rigorosa de receptividade do estigma (fase feminina) e a liberação de pólen (fase masculina), característica que as torna funcionalmente auto-incompatíveis (Mayo et al., 1997). O início da fase feminina é marcado pelo aumento acentuado da temperatura (de 10 a 14°C acima da temperatura ambiente) e a liberação de um aroma intenso. Um evento de aquecimento menos intenso e mais curto pode ocorrer na fase masculina da antese (Gibernau e Barabé, 2000; Gibernau et al., 1999a, 2003; Gottsberger et al., 2012). Entre as aráceas termogênicas, o gênero neotropical *Philodendron* Schott é de especial interesse em virtude de sua diversidade, que atualmente abarca mais de 500 espécies de epífitas e hemiepífitas (Mayo et al., 1997).

Besouros da tribo Cyclocephalini (Dynastinae; Scarabaeidae) são polinizadores conhecidos em muitas espécies de Araceae tropicais (Bernhardt, 2000; Moore & Jameson, 2013; Gottsberger, 1986; Schatz, 1990; Silberbauer-Gottsberger et al., 2003). Os besouros são normalmente atraídos a longa distância por compostos orgânicos voláteis produzidos pelas inflorescências e orientados por estímulos visuais, como a coloração da espata e espádice das inflorescências (Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 1991). A volatilização dos odores é facilitada pela termogênese, que ocorre no período noturno, coincidindo com o período de maior atividade dos besouros polinizadores (Gibernau e Barabé, 2000; Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 1991).

Besouros Cyclocephalini são conhecidos como visitantes florais indiscriminados, pois a mesma espécie de besouro pode visitar e polinizar diferentes espécies de planta em floração (Schatz, 1990). Os besouros podem visitar flores de plantas que pertencem ao mesmo gênero, como é conhecido para *Dieffenbachia* (Young, 1986) e *Philodendron* (Gibernau e Barabé, 2002; Gibernau et al., 1999a, 2000), ou flores de diferentes gêneros, tribos ou mesmo famílias (Gottsberger, 1986; Schatz, 1990). O gênero *Cyclocephala* é o mais diverso da tribo Cyclocephalini, contando com mais de 350 espécies com distribuição predominantemente neotropical (Jameson et al., 2002; Ratcliffe e Cave, 2009). Espécies de *Cyclocephala* têm hábito noturno ou crepuscular e são responsáveis pela polinização de um grande número de plantas neotropicais de floração noturna. De acordo com o levantamento realizado por Moore e Jameson (2013) plantas pertencentes a 12 gêneros de Araceae são polinizadas por espécies de *Cyclocephala*. Assim como outros representantes da tribo Cyclocephalini, besouros adultos do gênero *Cyclocephala* geralmente se alimentam de pólen, exudados e tecidos florais (Endrödi, 1985). Espécies de *Cyclocephala* foram registradas como polinizadores de nove espécies de *Philodendron* (Araceae) em estudos da biologia de polinização realizados em áreas de floresta tropical úmida na Guiana Francesa (Gibernau e Barabé, 2002; Gibernau et al., 1999b, 2000), em áreas de Floresta Atlântica do Sudeste (Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 1991; Gottsberger et al., 2013; Pereira et al., 2014), e do Nordeste do Brasil (Maia e Schlindwein, 2006; Maia et al., 2010, 2013a).

*Cyclocephala celata* Dechambre, 1980 é o único polinizador efetivo em populações nativas de *Philodendron acutatum* Schott em áreas de Floresta Atlântica na região litorânea do Estado de Pernambuco (Maia et al., 2010). Indivíduos desta espécie também foram registrados como polinizadores de outras duas espécies de Araceae que ocorrem na mesma região: *Taccarum ulei* e *Caladium bicolor* (Aiton) Vent (Maia e Schlindwein, 2006). Os odores florais de *P. acutatum* e *T. ulei* possuem os mesmos compostos majoritários: diidro- $\beta$ -ionona e (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona, porém em diferentes proporções relativas (Maia et al., 2013a). *C. bicolor* possui um conjunto de voláteis florais completamente diferente de *P. acutatum* e *T. ulei*, com predomínio de 4-metil-5-viniltiazol (36,25 %) e os compostos aromáticos benzenóides 1,3,5-Trimetoxibenzeno (31,49 %) e salicilato de metila (15,56 %) (Maia et al., 2012). Tendo em conta que os períodos de floração de *P. acutatum*, *C. bicolor* e *T. ulei* se sobrepõem parcialmente na área de estudo, é esperado que os besouros exibam algum nível de especialização temporal em relação à planta hospedeira, mesmo em polinizadores generalistas (Maia et al., 2013b). Os besouros são atraídos a longa distância pelos odores florais emanados

pelas inflorescências e se agregam dentro das câmaras florais. Até dezenas de besouros podem ser encontrados em uma única inflorescência.

As inflorescências geralmente funcionam como sítios de agregação para os Cyclocephalini antófilos. Eles se acasalam dentro da câmara floral, beneficiando-se do calor liberado pelas inflorescências para manter seus altos níveis de atividade metabólica (Seymour e Matthews, 2006; Seymour et al., 2009). Schatz (1990) especula que os odores florais funcionam como semioquímicos que desencadeiam o comportamento de agregação em besouros Cyclocephalini.

No interior das câmaras florais altamente perfumadas, os besouros antófilos devem ser capazes de se reconhecer uns aos outros e de distinguir entre machos e fêmeas de sua espécie para assegurar o sucesso reprodutivo. Em muitos taxa de insetos, tal reconhecimento é possível devido à presença de compostos espécie-específicos encontrados nas epicutículas desses artrópodes que atuam como feromônios de contato (identificados pelo contato direto entre as antenas e palpos de um indivíduo e a cutícula de outro) (Blomquist e Bagnères, 2010; van Wilgenburg et al., 2010). O grupo de compostos mais estudado são os hidrocarbonetos cuticulares, que estão presentes na camada lipídica epicuticular de todos os insetos. Os hidrocarbonetos cuticulares são normalmente misturas complexas de moléculas e diferem interespecificamente quanto à sua composição química e proporção relativa de seus componentes. Para uma determinada espécie, a composição dos hidrocarbonetos cuticulares pode transmitir aos indivíduos co-específicos informações sobre a fertilidade de um indivíduo, sexo, gênero, casta, graus de parentesco, etc (Blomquist e Bagnères, 2010; Howard e Blomquist, 1982, 2005; Pureswaran e Poland, 2009). A especificidade dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares e sua detecção pelos insetos é um dos pontos-chave no isolamento reprodutivo das espécies (Peterson et al., 2007; Zhang et al., 2014).

Apesar da importância dos besouros antófilos na polinização de plantas tropicais, dados sobre os sinomônios envolvidos na atração de besouros Cyclocephalini às plantas por eles polinizadas são escassos. Este capítulo tem como objetivo o estudo das respostas eletrofisiológicas e comportamentais de *C. celata* frente aos odores florais emanados pelas inflorescências de *Philodendron acutatum* (Araceae), bem como o estudo das respostas comportamentais de fêmeas de *C. celata* ao extrato de machos co-específicos.

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1 Área de coleta

Coletas de indivíduos adultos de *Cyclocephala celata* e de inflorescências de *Philodendron acutatum* foram realizadas em um fragmento de Floresta Atlântica localizado no município de Igarassu e pertencente à Usina de São José (7°45'S; 35°02'W, altitude aproximada 110 m). Nesta região, encontram-se fragmentos de cobertura vegetal nativa, cercados por campos cultivados com cana-de-açúcar. Nas bordas dos fragmentos são encontradas populações nativas de *P. acutatum* que florescem entre os meses de fevereiro a maio, de acordo com o regime de chuvas.

A área de coleta pertence à região da Zona da Mata Norte do estado de Pernambuco, dentro do domínio da Floresta Atlântica Nordestina. O clima predominante é o tropical úmido As' de acordo com a classificação de Köppen. A temperatura média varia entre 24° C e 27° C e a precipitação pluviométrica média anual varia de 1.600 mm a pouco mais de 2.000 mm. Embora as estações não sejam distintas, há uma marcada estação chuvosa, que se estende de abril a agosto, com um período mais seco nos meses de novembro e dezembro (AGRITEMPO, 2014).

### 4.2.2 Extração de voláteis florais

A extração dos voláteis florais foi realizada por meio de *headspace* dinâmico. Os *traps* utilizados para a coleta de voláteis foram preparados em laboratório, usando tubos de vidro de 10 cm de comprimento e 5 mm de diâmetro. Os tubos passaram por banho ultrassônico em metanol por 10 minutos e em seguida foram lavados com água destilada e secos em estufa de esterilização a 90°C, antes de serem preenchidos com o material adsorvente. Cada tubo recebeu 50 mg de uma mistura 1:1 dos adsorventes Tenax<sup>TM</sup> TA (malha 60/80, Supelco 1-1982) e Carboxen<sup>TM</sup> X (malha 40/60 Supelco 10436). As extremidades dos tubos foram fechadas com lã de vidro silanizada (Supelco 2-0411). Tubos semelhantes foram utilizados para o preparo dos filtros, contendo 50 mg de carvão ativado (malha 8-20 Sigma-Aldrich C2889) e fechados com lã de vidro. Antes da extração dos voláteis os *traps* e os filtros de carvão ativado foram lavados com hexano bidestilado e condicionados por meio de aquecimento a 190° ± 10° C por 3h. Não foi utilizado fluxo de nitrogênio durante o condicionamento dos *traps*, pois análise por GC do hexano eluído dos *traps* após o aquecimento (190° ± 10° C por 3h) mostrou não haver resíduos nos adsorventes.

A coleta dos odores florais de *P. acutatum* foi realizada em laboratório com inflorescências coletadas em campo. Um estudo prévio com esta espécie, realizado por Maia et al, 2010, mostrou não haver diferenças na liberação de voláteis entre inflorescências levadas ao laboratório após coleta em campo e inflorescências que tiveram seus voláteis extraídos *in situ*, evidenciando que o corte das inflorescências não altera significativamente a liberação dos odores florais em *P. acutatum*.

Inflorescências de *P. acutatum* no primeiro dia da antese foram colocadas em sacos de poliéster (31 cm x 41 cm, AssaPratsy, Alumileste) para a extração dos voláteis florais liberados durante o período de termogênese. Simultaneamente, realizou-se a extração de voláteis de uma amostra controle, contendo apenas o saco vazio. Foi utilizado para cada saco um filtro de carvão ativado para filtração do ar, que foi puxado por meio de bombas de vácuo (modelo G 12/01EB, ASF Thomas, Inc. Alemanha) a um fluxo constante de 0,8 L/min. A captura de voláteis foi feita nos *traps* de tenax/carbopack durante 30 minutos. Após a extração dos odores os voláteis foram eluídos com 150 µL de hexano. Os frascos com os voláteis foram guardados sob refrigeração a -5° C até serem requeridos para os testes.

#### **4.2.3 Análise de voláteis por Cromatografia gasosa (CG) e Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CGEM)**

Os voláteis florais foram analisados em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo Agilent 5975C Series (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) equipado com coluna apolar HP-5 (Agilent J&W, 60 m × 0.25 mm diâmetro interno; espessura do filme 0.25 µm). As amostras foram analisadas sob as seguintes condições: temperatura inicial de 40°C (mantida por 2 min), velocidade de aquecimento de 4°C/min e temperatura final de 230°C (mantida por 5 min). O gás de arraste utilizado foi o hélio, a fluxo constante de 1 mL por minuto e a temperatura do injetor foi mantida a 250°C. Os compostos eluídos da coluna cromatográfica foram ionizados por impacto de elétrons a 70 eV. A fonte de ionização foi mantida a 230° C e o quadrupolo a 150°C. Os espectros de massa foram obtidos no modo *scan* com velocidade de 0,5 scan por segundo, com faixa de varredura de *m/z* de 35 a 350. Uma alíquota de 1 µL da amostra de voláteis florais foi injetada com o injetor no modo *split* de 1:30.

Os compostos foram identificados por meio da análise dos espectros de massas de cada pico cromatográfico, comparação com padrões autênticos e cálculo de índices de retenção. Foram calculados os índices de retenção linear dos componentes dos odores florais utilizando-

se os tempos de retenção de cada composto e os tempos de retenção de uma série de alcanos (C 9 a C 30) analisados sob as mesmas condições. Os valores calculados foram comparados com os índices de retenção publicados na literatura (Adams, 2007; NIST WebBook, 2014).

A porcentagem relativa para os compostos presentes na mistura foi obtida com a injeção da amostra de odor floral em um cromatógrafo gasoso (Thermo Trace GC Ultra, Thermo Scientific, Milan, Italy) equipado com coluna VB-5 (30 m de comprimento, 0.25 mm de diâmetro interno, 0.25  $\mu$ m de espessura do filme, ValcoBond), detector de ionização por chama (FID) e injetor *split/splitless*. A programação de temperatura no cromatógrafo gasoso foi a mesma utilizada nas análises por CGEM. O modo de injeção utilizado nessas análises foi *split* de 1:10.

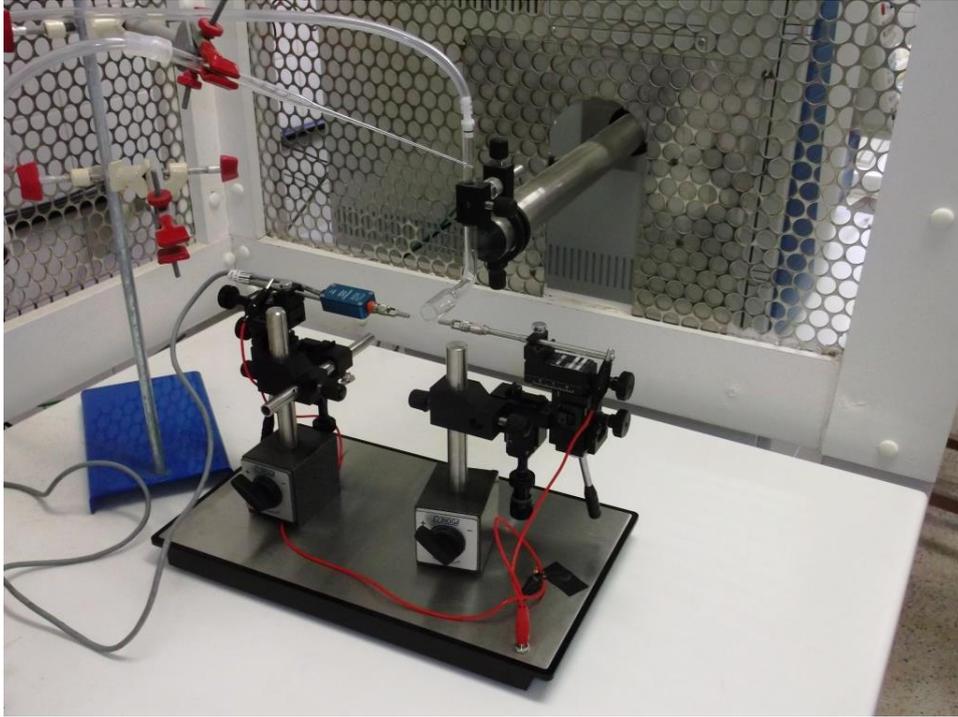
#### 4.2.4 Coleta de besouros

Os besouros foram coletados manualmente dentro de inflorescências de *P. acutatum* no segundo dia da antese. As coletas foram realizadas em abril de 2013, de março a maio de 2014 e em maio de 2015. As coletas foram realizadas nos períodos diurno ou vespertino.

Os besouros coletados foram mantidos em recipientes de plástico semitransparente (30 cm de comprimento, 21 cm de altura e 21 cm de largura), contendo terra vegetal (Terra Jupinay, produzida pela Granja Jupinay, Glória de Goitá-PE) peneirada e umedecida. Os terrários foram colocados no insetário do Laboratório de Ecologia Química e mantidos à temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuridão. Os besouros foram alimentados com pedaços de maçã (Maia, 2011), colocados dentro do terrário sobre placas de Petri. Os terrários receberam pedaços frescos de maçã a cada dois dias.

#### 4.2.5 Testes eletrofisiológicos

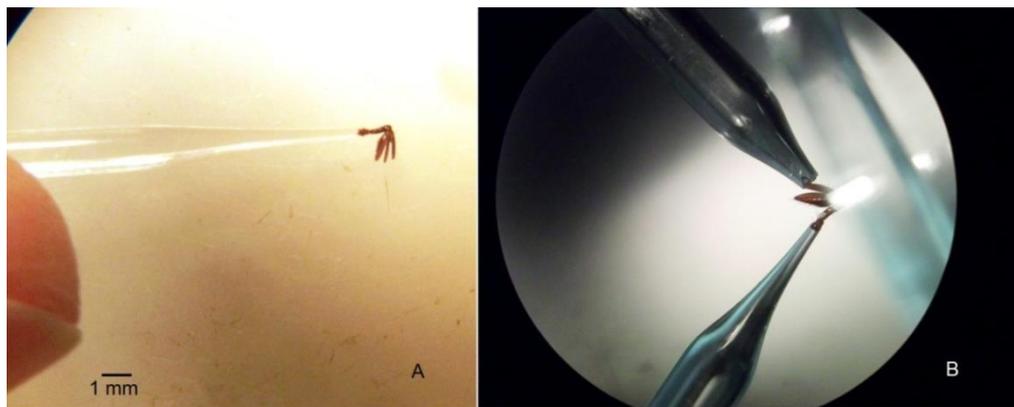
A resposta eletrofisiológica de antenas de *C. celata* a voláteis emitidos pelas inflorescências de *P. acutatum* foi investigada por meio de cromatografia gasosa acoplada a um detector eletroanténográfico (GC-EAD). O sistema de GC-EAD consiste em um cromatógrafo gasoso (Thermo Trace GC Ultra, Thermo Scientific, Milan, Italy) equipado com um detector de ionização por chama (FID) e injetor *split/splitless*, acoplado a um aparelho de EAD (Syntech, Kirchzarten, Germany) (Figura 4.1). O aparato de EAD é mantido dentro de uma gaiola de Faraday para minimizar interferências elétricas de origem externa.



**Figura 4.1:** Equipamento de EAD utilizado (Foto: G.K.N. Santos)

O aparato de EAD consiste em um módulo controlador da temperatura da linha de transferência (TC-02), um módulo controlador de estímulos (CS-55) e um módulo que controla a aquisição de dados captados pelos eletrodos (IDAC-4). O cromatógrafo gasoso foi equipado com uma coluna VB-5 (30 m de comprimento, 0.25 mm de diâmetro interno, 0.25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme, ValcoBond). Nitrogênio foi usado como gás de arraste, mantido a fluxo constante de 1 mL/min. A temperatura inicial do forno foi de 60°C (mantida por 1 min), programada para aumentar até 200°C a uma velocidade de aquecimento de 7°C/min. A temperatura final foi mantida por 2 minutos. O injetor, o detector e a linha de transferência para o EAD foram mantidos a 200°C. Ao final da coluna capilar, o efluente da coluna foi dividido em duas partes: uma para o FID e outra para a linha de transferência do EAD. Os tubos da conexão são feitos de sílica fundida desativada e ambos possuem o mesmo diâmetro e comprimento, de forma que os compostos chegam simultaneamente ao detector FID e à antena do inseto. Um gás de make-up ( $\text{N}_2$ ) foi adicionado antes do divisor T. A saída do EAD foi colocada em um fluxo de ar limpo e umidificado direcionado à antena montada. Os testes eletroantegráficos preliminares foram conduzidos com o injetor no modo *splitless*, testes posteriores foram feitos com injetor no modo *Split* com valores variáveis de divisão (de 1:10 até 1:50).

Para a preparação das antenas, os besouros foram colocados sob refrigeração a 4°C por 15 a 20 minutos. Com auxílio de uma micro tesoura cirúrgica, uma das antenas foi cortada na altura do pedicelo e introduzida em um capilar de vidro contendo solução de Ringer (8.0 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 0.4 g/L CaCl<sub>2</sub>). A antena foi então colocada sobre uma placa de Petri preenchida com parafina e com o auxílio de um alfinete entomológico as lamelas foram cuidadosamente abertas e um minúsculo floco de parafina foi colocado entre uma lamela e outra para que a antena permanecesse aberta durante a análise de GC-EAD. Todo o processo de preparação da antena foi realizado com auxílio de um microscópio estereoscópico, usando um aumento de 20 a 40 vezes. Após a abertura da antena, a ponta distal de uma das lamelas é cortada com um estilete. A antena é então conectada a um eletrodo de prata e o circuito fechado ao conectar a ponta cortada da antena a um segundo capilar de vidro contendo solução de Ringer e conectado ao eletrodo (Figura 4.2).



**Figura 4.2:** (A) Antena de *Cyclocephala celata* com as lamelas abertas e ponta distal inserida em um capilar contendo solução de Ringer. Visualização sob microscópio estereoscópico com aumento de 10X. (B) Antena montada entre os dois capilares com solução de Ringer. Aumento de 10X. (Fotos: G.K.N. Santos)

Antes da injeção da amostra, a sensibilidade da antena era testada por meio de uma rápida rajada de ar (0,5 s) passando por uma pipeta contendo um pedaço de papel de filtro impregnado com odor floral, procedimento conhecido como “*puff*”. Se a antena mostrasse uma resposta perceptível ao *puff*, uma alíquota de 1 µL da amostra de odor floral era então injetada no cromatógrafo. Um composto foi considerado ativo quando promoveu a despolarização da antena de, pelo menos, 5 indivíduos.

#### **4.2.6 Preparação dos extratos de cutículas de *Cyclocephala celata* em hexano**

A extração dos hidrocarbonetos cuticulares foi realizada de acordo com a metodologia descrita no tópico 3.2.1, na página 38.

#### **4.2.7 Testes comportamentais**

Os ensaios comportamentais com os besouros da espécie *C. celata* foram realizados por meio de testes de dupla escolha em um olfatômetro em Y de vidro com 24 mm de diâmetro, composto de um tubo central com 20 cm de comprimento bifurcado em braços com 30 cm cada. Ar filtrado através de filtros de carvão ativado foi bombeado para dentro do tubo a um fluxo de 0,8 L/min por meio de uma bomba de vácuo (ASF Thomas, Inc., Alemanha) alimentada por uma bateria de 9V. Para os testes comportamentais, um pedaço de papel de filtro com 4 cm de comprimento e 1 cm de largura, dobrado em forma de sanfona, foi impregnado com odor floral ou composto puro e posicionado no final de um dos braços do tubo (braço teste). No outro braço, um pedaço de papel idêntico recebeu apenas hexano (braço controle). Esperou-se a completa evaporação do solvente antes de introduzir os papéis impregnados dentro do tubo.

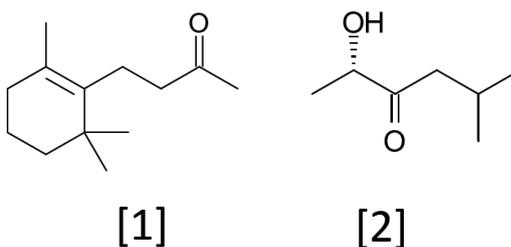
Os besouros foram levados ao laboratório 40 minutos antes do início dos testes, foram retirados do terrário e inseridos individualmente no tubo em Y. Cada inseto foi testado apenas uma vez e observado por até 10 minutos. Os papéis de filtro contendo as substâncias a serem testadas foram trocados a cada ensaio. Após 5 testes, o tubo em Y foi lavado com água destilada, etanol e acetona e seco em estufa de esterilização a 90° C, para assegurar a retirada de todos os voláteis presentes no tubo. O experimento foi então montado novamente e a posição dos braços teste e controle foi invertida (rotação de 180°), para assegurar que não havia preferência por lado. Foi considerado como escolha quando um besouro percorreu 21 cm ao longo de um dos braços do tubo e permaneceu lá por pelo menos 1 minuto. Foi considerado como não escolha quando os besouros permaneceram no tubo central por 10 minutos (Figura 4.3).



**Figura 4.3:** Teste de olfatômetro em tubo em Y. Em detalhe, é mostrado o posicionamento do papel de filtro contendo o estímulo dentro do tubo. (Fotos: G.K.N. Santos)

#### 4.2.7.1 Testes com voláteis florais

Foram realizados testes comportamentais com o intuito de observar a resposta de machos e fêmeas de *C. celata* aos voláteis florais de *P. acutatum*, e aos dois compostos majoritários presentes no odor: diidro- $\beta$ -ionona (SAFC, pureza >90% W36,260-3) [1] e (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona [2], sintetizado em laboratório (Maia et al., 2013b), bem como a uma mistura destes dois compostos. Esperou-se dois minutos para a completa evaporação do solvente antes de introduzir os papéis impregnados com os voláteis dentro do tubo.



Para cada possível atraente (odor floral, os dois compostos majoritários e a mistura) foram realizados dois ensaios em dias diferentes. Alíquotas de 5  $\mu$ L do headspace das inflorescências de *P. acutatum* foram testadas contra 5  $\mu$ L de hexano para verificar a resposta de *C. celata* ao odor floral (1<sup>o</sup> teste 23/03/14, n=25; 2<sup>o</sup> teste 04/04/14, n=20). Ensaios com diidro- $\beta$ -ionona (1<sup>o</sup> teste 25/03/14, n=29; 2<sup>o</sup> teste 08/04/14, n=32) foram realizados com 2  $\mu$ L de uma solução contendo 4,19g/L deste composto em hexano. Nestes testes, 2  $\mu$ L de hexano foram usados como controle. Para os testes com (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona, uma solução de 16,7 g/L foi

preparada. No primeiro teste para este composto (26/03/14, n=25) foi usada uma alíquota de 2 µL de solução contra 2 µL de hexano; no segundo ensaio (09/04/14, n=30) foi usado 1 µL de solução deste composto diluída (5,51 g/L). Os ensaios com a mistura de compostos majoritários de *P. acutatum* foram realizados inicialmente com uma alíquota de 1 µL de solução de cada composto (29/03/14, n=18). Posteriormente o teste foi realizado usando 2 µL de solução de diidro-β-ionona e 1 µL de solução diluída de (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona (05/04/14, n=30). O número de indivíduos em cada teste variou de acordo com o número de besouros disponíveis no momento do experimento, com uma média de 26 besouros por teste. Os testes foram realizados entre às 10:00 e 18:00 horas.

#### 4.2.7.2 Testes com extratos cuticulares

Foram realizados testes comportamentais em olfatômetro em Y para avaliar a resposta de fêmeas e machos de *C. celata* ao extrato de cutículas desta espécie. A montagem do sistema de olfatometria e a condução do experimento seguiram a mesma metodologia descrita para os bioensaios realizados com os voláteis florais. Para este teste foram realizados ensaios preliminares, usando um besouro (macho ou fêmea) em um dos braços do tubo e em seguida introduzindo um besouro (macho ou fêmea) no tubo central. Os ensaios preliminares nortearam os testes com extratos cuticulares, nos quais um dos braços do olfatômetro recebeu um pedaço de papel (4,0 x 1,0 cm) dobrado em forma de sanfona impregnado com 50 µL de extrato de cutícula de *C. celata*. O segundo braço recebeu a quantidade equivalente em hexano bidestilado, grau GC. Antes da colocação dos papéis no olfatômetro, esperou-se cerca de 5 minutos para a evaporação do solvente. Os testes foram realizados durante a tarde, entre os dias 19 e 22 de março de 2014. Foram testados 20 fêmeas e 10 machos.

#### 4.2.7.3 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico Bioestat 5.3. Inicialmente foi realizado um teste exato de Fisher para verificar se havia diferença nos padrões de resposta de machos e fêmeas aos estímulos testados. Após a verificação inicial, as respostas de machos e fêmeas de *C. celata* aos semioquímicos testados foram agrupadas para a execução do teste binomial, para determinar se a distribuição das respostas dos besouros foi significativamente diferente de uma distribuição 1:1. As respostas das fêmeas de *C. celata* ao extrato cuticular de macho desta espécie foram analisadas por meio de teste binomial. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Os besouros que não responderam durante o bioensaio em tubo em Y foram excluídos das análises.

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Voláteis florais

Através da técnica de *headspace* dinâmico, os odores florais liberados durante a termogênese floral foram amostrados. As inflorescências de *P. acutatum* exalam durante este período fragrâncias intensas que podem ser percebidas pelo nariz humano a alguns metros de distância. Nesta Araceae, o odor floral é composto principalmente pelo terpeno irregular diidro- $\beta$ -ionona, que representa 80,63 % dos componentes voláteis e (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona que representa 15,12 % da composição (Tabela 4.1). Juntos, esses dois componentes são responsáveis por mais de 95% da composição dos voláteis nesta espécie.

**Tabela 4.1** Composição do odor floral emitido durante a fase termogênica feminina em *Philodendron acutatum* (Araceae) (amostra usada nos testes comportamentais)

Compostos	IR calc	IR lit <sup>1</sup>	%
Alifáticos			
<b>(S)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona</b>	949	*	15,12
<b>3-hidroxi-5-metil-2-hexanona</b>	951	*	0,5
Benzenóides e fenilpropanóides			
<b>Salicilato de metila</b>	1195	1193/1200	0,76
Compostos contendo N			
<b>2-Metoxi-3-isopropilpirazina</b>	1094	*	0,41
Terpenóides			
<b>Diidro-<math>\beta</math>-ionona</b>	1448	*	80,63
<b>Diidro-<math>\beta</math>-ionol</b>	1450	1455	Traço
<b><math>\beta</math>-ionona</b>	1487	1487	Traço
Outros compostos cíclicos			
<b>Metil-epijasmonato</b>	1672	1676	0,41
Compostos minoritários não identificados			0,22

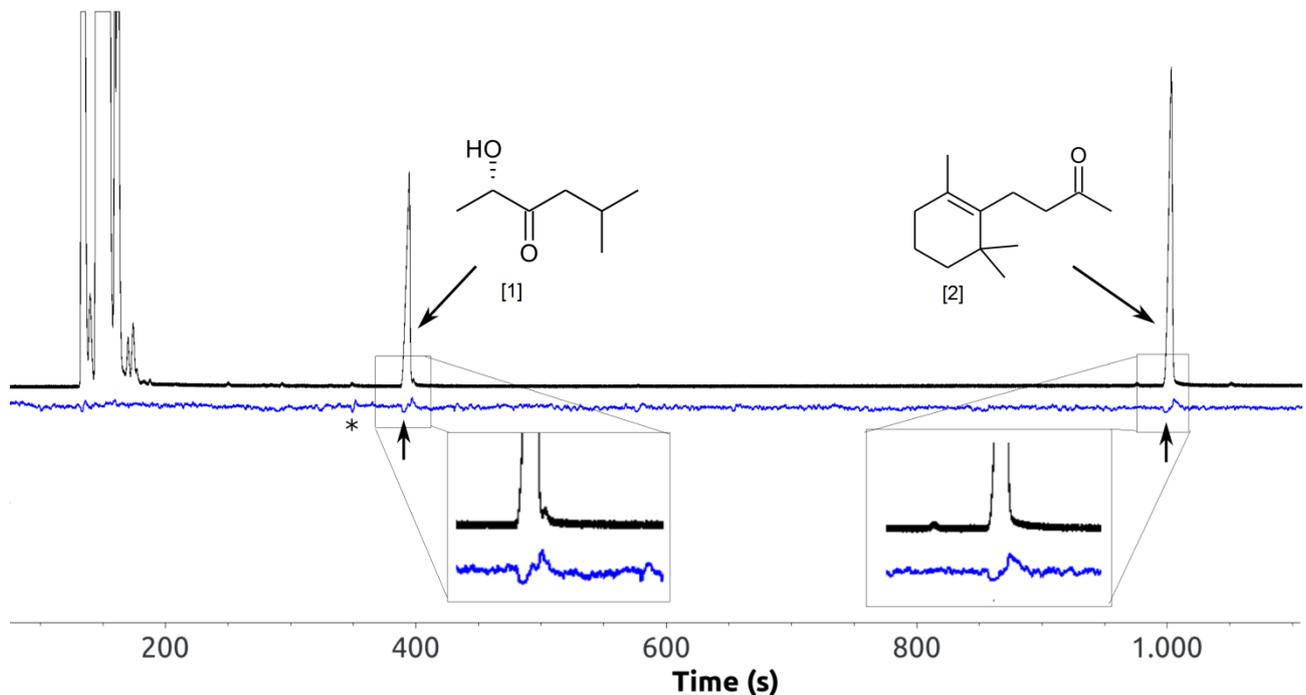
\*Compostos identificados por comparação com padrões

<sup>1</sup> Adams, 2007; Nist Webbook, 2014

### 4.3.2 Eletroantenografia em *Cyclocephala celata*

Durante os testes eletrofisiológicos realizados com as antenas de *C. celata* coletados em campo, machos e fêmeas desta espécie responderam aos compostos majoritários presentes no

*headspace* de *P. acutatum*: (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona e diidro- $\beta$ -ionona (Figura 4.4). As antenas de *C. celata* são mais delicadas e difíceis de estabilizar do que as de outras espécies de Cyclocephalini testadas durante o desenvolvimento deste trabalho. A intensidade das respostas para cada composto variou de indivíduo para indivíduo, sendo muitas vezes sutil, com despolarização da ordem de 60 a 320  $\mu$ V. Outro fator que influenciou as respostas eletroantenográficas foi a concentração dos compostos. Em testes preliminares realizados com o injetor do cromatógrafo em modo *splitless*, as antenas de *C. celata* não apresentaram resposta. Respostas mais expressivas para os componentes majoritários foram observadas em análises empregando o modo de injeção *split* com razão de 1:10 ou 1:20. A resposta da antena para *puff* com o odor floral era mais intensa do que a resposta para os componentes isolados (com despolarização na ordem de 1mV) durante o teste eletroantenográfico e visível mesmo em antenas um pouco instáveis.



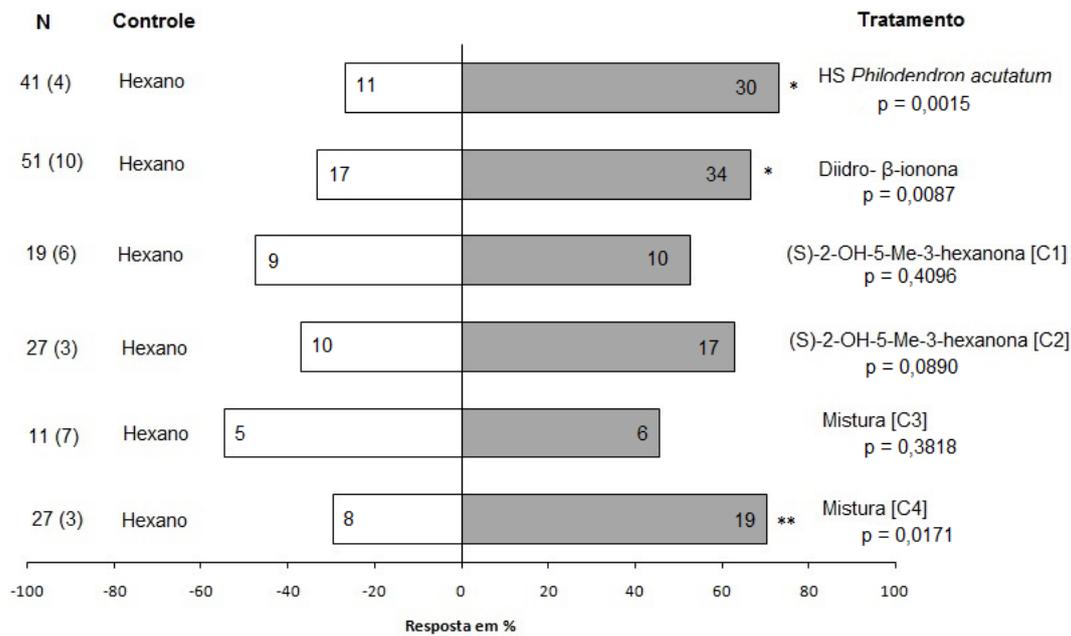
**Figura 4.4:** Resposta eletrofisiológica de antena de *Cyclocephala celata* (Melolonthidae; Dynastini) macho a (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona [1] e diidro- $\beta$ -ionona [2] presentes em uma amostra de *headspace* dinâmico obtido por aeração por 30 minutos de inflorescência de *Philodendron acutatum* (Araceae) durante a fase termogênica do primeiro dia da antese. A amplitude de resposta a [1] foi de 140  $\mu$ V, e a [2] de 160  $\mu$ V. O \* mostra uma resposta não reprodutível.

### 4.3.3 Respostas para os testes de dupla escolha em olfatômetro

Nos bioensaios comportamentais em tubo em y para *C. celata* foram testados o odor floral de *P. acutatum*, os compostos majoritários presentes neste odor e extratos cuticulares co-específicos. Testes preliminares com os besouros indicaram não haver diferença de atividade entre o período da manhã e da tarde para esta espécie; durante a noite (após as 18:00 horas), no entanto, a maioria dos indivíduos permanecia no início do tubo central sem se moverem por vários minutos. Por esta razão, os bioensaios comportamentais para *C. celata* foram realizados entre 10 e 18 h. Dentro do tubo, os besouros movimentavam as antenas com as lamelas abertas, buscando a fonte de odor.

Nos bioensaios realizados com *C. celata*, o número de machos foi maior do que o número de fêmeas. Essa desproporção entre os sexos reflete a situação encontrada no interior das inflorescências, com maior número de machos em relação ao número de fêmeas nas coletas realizadas. Apesar da diferença no número de machos e fêmeas, o teste exato de Fisher mostrou que a resposta comportamental de ambos os sexos aos compostos testados foi similar (odor floral  $p = 0,9998$ ; diidro- $\beta$ -ionona  $p = 1,000$ ; (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona [C1]  $p = 0,6563$ ; (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona [C2]  $p = 0,9991$ ; mistura [C3]  $p = 0,5671$  e mistura [C4]  $p = 0,9991$ ). Desta maneira, as respostas de machos e fêmeas aos semioquímicos foram somadas para a execução do teste binomial.

Os besouros foram atraídos pelo odor floral de *P. acutatum* ( $p = 0,0015$ ); nos testes realizados com a solução de diidro- $\beta$ -ionona também foi observado maior número de indivíduos que se dirigiram ao braço teste do olfatômetro ( $p = 0,0087$ ) (Figura 4.5).



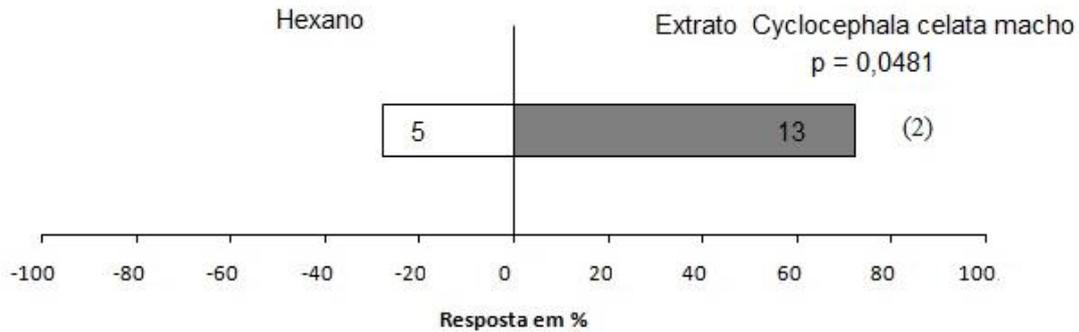
**Figura 4.5:** Respostas (em %) de besouros *Cyclocephala celata* (Melolonthidae; Dynastini) aos estímulos testados em bioensaios de dupla escolha em olfatômetro em Y. Os números à esquerda do gráfico mostram a quantidade de besouros que responderam em cada teste, enquanto que o número entre parênteses mostram aqueles que não responderam. Os números dentro das barras indicam o número de besouros que escolheram o tratamento ou o controle em cada teste. \* Indica os testes significativos para  $p < 0,01$  e \*\* indica o teste significativo para  $p < 0,05$  nos testes binomiais. Em todos os bioensaios, hexano foi usado como controle.

Os testes em olfatômetro em Y com (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona foram realizados para duas concentrações. A primeira solução foi preparada com a concentração  $0,0167 \text{ g mL}^{-1}$  [C1], visto que este composto em alta concentração se mostrou atrativo para besouros *Cyclocephalini* em testes de campo (Maia et al., 2013a). No teste realizado com a solução concentrada não houve diferença entre o número de besouros que escolheram o braço teste e os que escolheram o braço controle ( $p = 0,4096$ ). Para o segundo teste, a solução de (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona foi diluída para  $0,00384 \text{ g mL}^{-1}$  [C2]. Novamente não foi observada diferença estatisticamente significativa no número de indivíduos que escolheram o tratamento ou o controle ( $p = 0,0890$ ), embora seja possível observar uma tendência de atratividade para esta concentração (Figura 4.5).

Foi testada também a atratividade da mistura binária contendo os dois compostos majoritários e ativos eletrofisiologicamente presentes no odor floral de *P. acutatum*. O primeiro teste foi realizado com alíquotas de 1µL da solução de diidro-β-ionona e 1µL da solução de (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona [C1]. Neste bioensaio não houve diferença significativa entre o número de besouros que escolheram o braço teste e aqueles que escolheram o braço controle ( $p = 0,3818$ ). No segundo teste foi usada uma alíquota de 1µL da solução (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona [C2] e 2µL da solução de diidro-β-ionona, de forma que a concentração e a proporção dos compostos se assemelhassem à encontrada no odor natural da inflorescência. Essa mistura mostrou-se atrativa ( $p = 0,0171$ ) no teste (Figura 4.5).

#### **4.3.4 Resposta de *Cyclocephala celata* ao teste com extrato cuticular**

O comportamento de machos e fêmeas de *C. celata* foi observado em laboratório em cubas de vidro forradas com papel de filtro. Nestas observações foi possível verificar que, na maioria das vezes, a fêmea se aproxima do macho, e ao chegar bem próximo ambos iniciam um ritual de reconhecimento, tocando-se com as antenas e palpos. Um experimento preliminar, feito em olfatômetro em Y com fêmeas e machos vivos, mostrou que quando um macho era colocado em um dos braços do olfatômetro, a fêmea ou macho colocado no início do tubo quase sempre se deslocava até o macho na extremidade do braço (10 fêmeas de um total de 12 e 3 machos de um total de 5). No experimento com o extrato cuticular em hexano de *C. celata* macho, as fêmeas colocadas no início do olfatômetro se deslocaram até o braço contendo o papel impregnado com o extrato em proporção significativamente maior do que o braço controle ( $p = 0,0481$ ) (Figura 4.6). No biensaio com extrato cuticular de fêmeas foram testados 10 machos, dos quais 4 se dirigiram ao braço controle, 4 caminharam em direção ao braço teste e 2 permaneceram no tubo central.



**Figura 4.6** Respostas (em %) de besouros *Cyclocephala celata* (Melolonthidae; Dynastini) fêmeas ao extrato hexânico de cutícula de macho co-específico em teste de dupla escolha em olfatômetro em Y ( $p < 0,05$ ). Os números dentro das barras indicam o número de besouros que optou por cada braço, enquanto que o número entre parênteses indica o número de besouros que não responderam ao teste.

#### 4.4 DISCUSSÃO

##### 4.4.1 Odores florais

O odor floral *P. acutatum* é dominado pelo composto alifático (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona e pelo terpenóide diidro- $\beta$ -ionona. Os voláteis exalados pela inflorescência de *P. acutatum* durante a fase feminina da antese foram estudados previamente por Maia et al (2010), que identificaram diidro- $\beta$ -ionona ( $75,41 \% \pm 6,63 \%$ ) e (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona ( $23,11 \pm 7,15 \%$ ) nas inflorescências analisadas. 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona é um composto incomum em odores florais, embora tenha sido identificado previamente como um composto minoritário em *Drypetes natalensis* (Putranjivaceae) (Johnson et al., 2009) Já a diidro- $\beta$ -ionona foi descrita como integrante dos odores florais em várias espécies de plantas (Knudsen et al., 2006).

##### 4.4.2 Respostas eletrofisiológicas

No presente trabalho foi desenvolvida uma nova técnica para montagem de antenas lameladas, típicas de besouros Melolonthidae. Neste tipo de antena, as lamelas precisam ser abertas durante a análise de CG-EAD para expor as sensilas olfativas presentes na superfície interna das lamelas. A abertura das lamelas pode ser realizada por meio do acoplamento de um

aparato de acrílico especificamente desenvolvido para este fim por Leal et al. (1992). A técnica desenvolvida neste trabalho permite a abertura das lamelas das antenas sem a necessidade do acoplamento de um aparato específico, permitindo seu uso em qualquer equipamento de GC-EAD. As lamelas foram mantidas abertas com minúsculos flocos de parafina, material que não interfere no sinal elétrico da antena. Nos testes eletrofisiológicos realizados com *C. celata* observou-se que esta espécie responde aos dois compostos majoritários presentes nos odores florais de *P. acutatum*: (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona e diidro- $\beta$ -ionona.

Não há registros na literatura até o momento de estudos eletrofisiológicos realizados com besouros polinizadores da tribo Cyclocephalini. De fato, os dados sobre os semioquímicos envolvidos na percepção do odor floral pelos besouros são conhecidos apenas para algumas espécies, através de captura em armadilhas e observação em campo dos besouros polinizadores com imitações de flores contendo odor. Utilizando armadilhas contendo (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona, Maia et al., (2013b) conseguiram capturar em campo *C. cearae* e *C. celata*. Gottsberger et al (2012) conseguiram atrair em campo indivíduos de *C. literata* utilizando réplicas de flores contendo metil-2-metil butirato, componente majoritário de *Magnolia ovata* (Magnoliaceae). Com um procedimento semelhante, Pereira et al. (2014) atraíram besouros *E. emarginata*, polinizadores de uma população de *Philodendron adamantinum* (Araceae), com cones de papel contendo os compostos majoritários metil jasmonato e diidro- $\beta$ -ionona, bem como uma mistura destes compostos. A atratividade observada para as armadilhas e iscas odoríferas é bem abaixo da observada para inflorescências reais, onde é frequente a presença de dezenas de besouros na mesma inflorescência (Gottsberger et al., 2012; Maia et al., 2010, 2012, 2013b). É possível que o calor gerado pela termogênese floral seja também um elemento importante na atratividade dos besouros às inflorescências.

Evidência da função direta da termogênese no comportamento dos polinizadores foi observada em *Helicodiceros muscivorus* (Araceae), cujo odor floral mimetiza os compostos liberados durante a decomposição de carcaças de animais (Angioy et al., 2004). Os autores observaram que a atração das moscas a flores no segundo dia da antese aquecidas artificialmente e perfumadas com os odores sintéticos eram tão intensas quanto à observada para as flores no primeiro dia da antese, durante a termogênese, e significativamente maior do que flores no segundo dia contendo odores, mas não aquecidas.

Nos testes de GC-EAD observou-se que a intensidade das respostas das antenas de *C. celata* varia de acordo com a concentração dos compostos. Em testes preliminares realizados com a injeção de uma alíquota de 1 $\mu$ L de odor floral em modo *splitless*, as antenas não respondiam aos compostos altamente concentrados. Segundo Gottsberger & Silberbauer-

Gottsberger (1991) os besouros utilizam os odores florais para se dirigirem às inflorescências a longas distâncias, mas necessitam de sinais visuais (cor clara da espata e espádice) para encontrar a inflorescência a curta distância. Nos experimentos realizados em campo por esses pesquisadores, espécimes de *E. emarginata* eram incapazes de localizar inflorescências cobertas com tecido escuro e se dirigiam a modelos de papel inodoros localizados próximo à inflorescência coberta ou permaneciam sobrevoando a região da inflorescência coberta se não havia um modelo ou outra inflorescência aberta nas proximidades. Esse comportamento, juntamente com os dados de eletrofisiologia, sugere que há um mecanismo que leva a antena a não responder aos voláteis florais quando estes estão presentes em alta concentração. Já foi demonstrado na literatura que a sensibilidade das sensilas antenais aumenta proporcionalmente à concentração dos compostos, porém, após certo limite de concentração, a antena entra em processo de saturação e a resposta não mais aumenta proporcionalmente à dose (Altafini, 2008; Henzell, 1974). Talvez esse seja um mecanismo importante para que os besouros sejam capazes de reconhecerem-se dentro da câmara floral saturada de odor.

#### 4.4.3 Respostas obtidas no olfatômetro em Y

Aromas florais são importantes para atração de polinizadores em muitos sistemas de polinização (Raguso, 2008). Nos testes realizados com o olfatômetro em Y foi observada quimiotaxia de *C. celata* para o odor floral de *P. acutatum*, bem como para o composto majoritário diidro- $\beta$ -ionona. Esses bioensaios mostraram que os sinais químicos (odores das inflorescências) desencadeiam a atração desses besouros polinizadores às plantas por eles polinizados.

O terpeno irregular diidro- $\beta$ -ionona está presente em muitas espécies de plantas, normalmente associado a outras iononas. Diidro- $\beta$ -ionona é o componente majoritário em *P. adamantinum*, representando cerca de 90 % da composição do odor exalado pelas inflorescências na fase feminina da antese (Pereira et al., 2014). A atividade atrativa de  $\beta$ -ionona já foi relatada para alguns insetos. Por exemplo,  $\beta$ -ionona tem sido utilizada como isca para machos de abelhas Euglossini em diversos ambientes neotropicais (Milet-Pinheiro e Schlindwein, 2005) e também é bastante atrativo para o besouro sul-africano *Anomala transvaalensis* (Rutelinae; Melolonthidae) (Donaldson et al., 1990). Apesar da atratividade observada para a diidro- $\beta$ -ionona nos testes com olfatômetro em Y realizado em laboratório, armadilhas contendo exclusivamente este composto não foram capazes de atrair um número significativo de besouros Cyclocephalini polinizadores (Maia et al., 2013b; Pereira et al., 2014).

Já armadilhas contendo (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona foram bem sucedidas na atração de alguns indivíduos de *C. celata* e *C. cearae* em campo (Maia et al., 2013b). Um número de fatores pode ter contribuído para a diferença observada entre os testes realizados em laboratório e os testes de campo. Considerando-se as propriedades físico-químicas de ambas as moléculas, 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona apresenta ponto de ebulição de 172,21°C a 760,00 mm/Hg e pressão de vapor de 0,426 mm/Hg a 25,00 °C; e a diidro- $\beta$ -ionona tem ponto de ebulição de 261,00 a 262,00 °C a 760,00 mm/Hg e pressão de vapor de 0,010 mm/Hg a 25,00 °C. A (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona, por ser mais volátil, pode dispersar-se por uma área maior e assim atrair mais besouros em campo.

Investigações acerca da resposta comportamental de besouros escarabeídeos a estímulos químicos têm demonstrado que misturas são mais atrativas do que compostos testados isoladamente, indicando que há um forte sinergismo dos compostos na indução do comportamento (Ladd e McGovern, 1980; Loughrin et al., 1995; Vuts et al., 2010; Williams et al., 1990). Nos testes eletrofisiológicos as antenas de *C. celata* mostraram uma resposta muito mais intensa ao odor floral do que aos compostos isolados. Nos bioensaios comportamentais em olfatômetro, no entanto, não foi observado aumento da atratividade da mistura binária (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona e diidro- $\beta$ -ionona em relação aos compostos testados isoladamente.

Em relação aos testes realizados com os extratos cuticulares em hexano em olfatômetro, é interessante notar que, apesar da baixa pressão de vapor dos compostos presentes no extrato (hidrocarbonetos de longa cadeia carbônica), foi possível verificar que o extrato de machos de *C. celata* é atrativo para fêmeas desta espécie. Os hidrocarbonetos cuticulares devem ser importantes no reconhecimento intraespecífico dos besouros polinizadores, que utilizam as inflorescências altamente perfumadas como sítios de agregação e acasalamento. Desafio semelhante é enfrentado pelo besouro *Oplostomus haroldi* (Cetoniidae) que é uma praga em colméias de produção de mel. Os besouros precisam distinguir os indivíduos co-específicos em meio a uma miríade de odores provenientes da colméia e utilizam o hidrocarboneto cuticular (*Z*)-9-pentacoseno (presente em maior proporção nas fêmeas) como feromônio sexual (Fombong et al., 2012).

Considerando-se a composição química do extrato cuticular de besouros *C. Celata* machos, mostrada na página 42, um dos compostos que poderia estar relacionado à atratividade do extrato é o alceno n-hentriacontano, presente apenas nos machos e um alceno monoinsaturado com 31 carbonos, que foi encontrado no extrato de todos os machos analisados, mas em apenas uma das fêmeas. Alcenos monoinsaturados já foram descritos como feromônios

sexuais de contato em outras espécies de besouros, como *Aleochara curtula* (Staphylinidae) que utiliza os alcenos monoinsaturados (*Z*)-7-heneicoseno e (*Z*)-7-tricoseno como feromônios sexuais (Peschke e Metzler, 1987) e *Megacyllene caryae* (Cerambycidae) no qual esta função é desempenhada pelo composto (*Z*)-9-nonacoseno presente na cutícula das fêmeas (Ginzel et al., 2006).

#### 4.5 CONCLUSÕES

Neste capítulo foi desenvolvida uma nova técnica para montagem de antenas lameladas de Melolonthidae em testes eletrofisiológicos. Com esta técnica foi demonstrada pela primeira vez na literatura a resposta eletrofisiológica de besouros antófilos da tribo Cyclocephalini a compostos voláteis exalados pelas inflorescências de *P. acutatum*. Também foi demonstrada a atração dos besouros *C. celata* aos odores florais em bioensaios comportamentais em olfatômetro, mostrando que os estímulos químicos desencadeiam a resposta comportamental de busca do besouro pela inflorescência. Os resultados dos testes realizados em olfatômetro mostram que o extrato cuticular de *C. celata* macho é atrativo para fêmeas desta espécie, indicando a presença de um possível feromônio sexual.

## **5 RESPOSTA ELETROFISIOLÓGICA E COMPORTAMENTAL DE *CYCLOCEPHALA CEARAE* (MELOLONTHIDAE; DYNASTINAE; CYCLOCEPHALINI) AOS ODORES FLORAIS DE *TACCARUM ULEI* (ARACEAE)**

### **5.1 INTRODUÇÃO**

Os sinais florais são componentes importantes nas interações entre plantas e seus polinizadores (Schiestl, 2010). Esses sinais englobam tanto aspectos visuais (como cor e formato da flor), como químicos (composição e concentração relativa dos constituintes do odor floral) que desencadeiam resposta em polinizadores (Raguso, 2008).

Na última década, um grande avanço foi obtido na compreensão das funções e evolução do aroma floral. Esse progresso foi alcançado através de estudos funcionais que frequentemente incluem testes eletrofisiológicos (eletroantenografia - EAG e cromatografia acoplada a um detector eletroantenográfico - EAD), bioensaios comportamentais com odores sintéticos e testes em campo com voláteis florais (Schiestl, 2015). Esses estudos permitem compreender aspectos comportamentais, ecológicos e até evolutivos das interações inseto-plantas. A percepção do polinizador e sua resposta comportamental constituem uma pressão seletiva para caracteres florais, pois medeiam as relações entre os sinais florais e a recepção e transporte de pólen (Schiestl e Johnson, 2013).

Os voláteis florais são especialmente importantes para a atração de polinizadores em interações inseto-plantas. Plantas polinizadas por um grupo ou táxon específico de insetos frequentemente apresentam convergência em relação à composição de seu odor floral (Dobson, 2006). Por exemplo, odores florais com prevalência de terpenóides e com baixa concentração de benzenóides e derivados de ácidos graxos são comuns em plantas polinizadas por abelhas (Groth et al., 1987; Knudsen e Mori, 1996; Levin et al., 2001). Moscas saprófitas são atraídas por plantas que produzem voláteis que mimetizam os odores de carcaças em decomposição e são tipicamente caracterizados pela presença de compostos contendo enxofre (oligosulfurados), juntamente com derivados de ácidos graxos (Kite, 2000; Stensmyr et al., 2002).

Numerosas angiospermas, que ocorrem em florestas neotropicais e savanas, têm flores que são polinizadas por besouros antófilos pertencentes à família Melolonthidae. Besouros da tribo Cyclocephalini (Melolonthidae; Dynastinae), em particular, são polinizadores conhecidos em muitas espécies de Araceae tropicais (Bernhardt, 2000; Moore & Jameson, 2013; Gottsberger, 1986; Schatz, 1990; Silberbauer-Gottsberger et al., 2003). Alguns aspectos característicos da cantarofilia (polinização por besouros) em Araceae incluem: a produção de

calor pelos tecidos florais (termogênese), liberação de forte odor, presença de uma recompensa alimentar (secreção estigmática, pólen em abundância e flores masculinas estéreis) e a presença de uma câmara floral, onde ocorre a agregação dos besouros. A produção de calor pelas flores é um aspecto importante na antese destas plantas e coincide com o hábito noturno ou crepuscular dos besouros, além de ajudar na volatilização dos odores florais (Ervik e Knudsen, 2003; Gottsberger, 1989; Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 1991). Os voláteis florais funcionam como semioquímicos de agregação, atraindo tanto machos quanto fêmeas dos besouros visitantes florais, o que aumenta a interdependência mutualística entre esses insetos e as plantas por eles polinizadas (Schatz, 1990). Os besouros permanecem na flor até que o pólen seja liberado (Gottsberger, 1986).

Convergência na composição do odor floral também foi encontrada em plantas polinizadas por besouros da tribo Cyclocephalini (Dobson, 2006). Embora apenas uma parte dos odores florais das plantas polinizadas por besouros desta tribo tenham sido estudados até o momento, foram encontrados compostos metoxilados ou hidroxilados que são raros em odores florais e alguns dos quais foram encontrados apenas em plantas polinizadas por besouros (Azuma et al., 1997; Dötterl et al., 2012; Ervik e Knudsen, 2003; Ervik et al., 1999; Knudsen et al., 2006; Maia et al., 2012). A atividade desses compostos na atração dos besouros polinizadores ainda é pouco entendida.

*Taccarum ulei* Eng. & K. Krause (Araceae, Spathicarpeae) é uma planta geófito nativa do Nordeste do Brasil e polinizada por besouros da espécie *Cyclocephala cearae* (Melolonthidae; Dynastinae; Cyclocephalini) (Maia et al., 2013a). Durante a fase termogênica, esta planta libera um intenso aroma floral composto principalmente por (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona e diidro- $\beta$ -ionona em altas concentrações, com uma taxa de emissão de voláteis de 430–850  $\mu\text{g h}^{-1}$  (Maia et al., 2013b). No dia seguinte à liberação dos voláteis florais (segundo dia da antese), os besouros *C. cearae* podem ser encontrados no interior da câmara floral, onde permanecem até que uma nova inflorescência comece a liberar o seu odor. Os besouros deixam então seu abrigo, carregando consigo o pólen da inflorescência que os abrigou no dia anterior.

Nas inflorescências de *T. ulei* também são frequentemente encontradas larvas de uma espécie ainda não identificada do gênero *Beebeomyia* sp. (Diptera; Richardiidae). Estas moscas usam as inflorescências de *T. ulei* como sítios de oviposição e suas larvas aparentemente se desenvolvem consumindo os tecidos florais e pólen (Maia et al., 2013b). Sabe-se que compostos orgânicos voláteis (COVs) são importantes não apenas nas interações mutualísticas entre plantas e animais, mas também nas relações antagonísticas; assim, a atração de mutualistas e antagonistas por COVs florais constituem um importante aspecto na ecologia evolutiva das

angiospermas (Schiestl, 2015). Os besouros polinizadores e as moscas florívoras podem utilizar os mesmos sinais olfativos para encontrar as inflorescências de *T. ulei* no ambiente.

Neste trabalho foram estudadas as respostas eletrofisiológicas e comportamentais de *C. cearae* ao odor floral de *T. ulei* e seus constituintes majoritários. Os dados mostrados neste capítulo fazem parte de um projeto que envolve o estudo do canal de comunicação dos besouros polinizadores e das moscas florívoras em *T. ulei*, porém apenas os dados referentes aos besouros serão apresentados aqui.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1 Áreas de coleta

Coletas de machos e fêmeas adultos de *Cyclocephala cearae* e inflorescências de *Taccarum ulei* foram realizadas em uma área pouco urbanizada às margens de um trecho da rodovia BR101 Norte que conecta os municípios de Abreu e Lima e Igarassu, em Pernambuco (7°73'S; 34°95'W, altitude aproximada 57 m). Esta área faz parte do domínio da Floresta Atlântica Nordestina, com clima tropical úmido As' de acordo com a classificação de Köppen. A temperatura média varia entre 24° C e 27° C e a precipitação pluviométrica média anual varia de 1.600 mm a pouco mais de 2.000 mm. Há uma marcada estação chuvosa que se estende de abril a agosto, com um período mais seco nos meses de novembro e dezembro (AGRITEMPO, 2014).

O período de floração de *T. ulei* ocorre de fevereiro a maio, com variações no início e término deste período de acordo com o regime de chuvas (Maia et al., 2013b). A ocorrência de chuvas nos primeiros meses do ano é determinante para o início do período de floração desta Araceae; em anos mais secos o início da floração se dá mais tardiamente.

Inflorescências de *T. ulei* que se encontravam no primeiro dia de antese foram levadas ao laboratório para extração dos voláteis florais exalados durante a fase termogênica do ciclo floral. *C. cearae* (machos e fêmeas) foram coletados manualmente dentro das inflorescências de *T. ulei* durante o período de floração desta Araceae. As inflorescências contendo os besouros foram levadas ao laboratório, onde foi feita a triagem dos insetos (Figura 5.1).



**Figura 5.1:** Inflorescência de *Taccarum ulei* (Araceae) contendo besouros *Cyclocephala cearae* (Melolonthidae; Dynastini) coletados em Igarassu. (Foto: P. Bezerra)

### 5.2.2 Manutenção dos besouros em laboratório

Os besouros coletados foram mantidos em recipientes plásticos semitransparentes (30 cm de comprimento, 21 cm de altura e 21 cm de largura), contendo terra vegetal peneirada e umedecida (Terra Jupinay, produzida pela Granja Jupinay, Glória de Goitá-PE). Os terrários foram colocados no insetário do Laboratório de Ecologia Química e mantidos à temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuridão. Os besouros foram alimentados com pedaços de maçã.

### 5.2.3 Extração de voláteis florais

A extração dos odores florais de *T. ulei* foi realizada em laboratório com inflorescências coletadas em campo. Inflorescências de *T. ulei* no primeiro dia da antese foram colocadas em sacos de poliéster (31 cm x 41 cm, AssaPratsy, Alumileste) logo após o início da termogênese para a extração dos voláteis florais liberados durante esta fase da antese. Simultaneamente, realizou-se a extração de voláteis de uma amostra controle, contendo apenas o saco vazio. Foi utilizado para cada saco um filtro de carvão ativado (malha 8-20 Sigma-Aldrich C2889) para

filtragem do ar, que foi puxado por meio de bombas de vácuo (modelo G 12/01EB, ASF Thomas, Inc. Alemanha) a um fluxo constante de 0,8 L/min. A captura de voláteis foi feita em *traps* contendo uma mistura 1:1 dos adsorventes tenax/carbopack (Tenax<sup>TM</sup> TA malha 60/80, Supelco 1-1982 e Carbopack<sup>TM</sup> X malha 40/60 Supelco 10436). Os odores florais foram coletados durante 150 minutos e os voláteis foram eluídos com 500 µL de hexano bidestilado, grau GC. O frasco com os voláteis foi guardado sob refrigeração a -5° C até serem requeridos para os testes.

#### 5.2.4 Análise de voláteis florais

Os voláteis capturados foram analisados em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) com analisador do tipo quadrupolo Agilent 5975C Series (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) equipado com coluna apolar HP-5 (Agilent J&W, 60 m × 0.25 mm diâmetro interno; espessura do filme 0.25 µm). As amostras foram analisadas sob as seguintes condições: temperatura inicial de 40°C (mantida por 2 min), rampa de aquecimento de 4°C/min e temperatura final de 230°C (mantida por 5 min). O gás de arraste utilizado foi o hélio, a fluxo constante de 1mL por minuto e a temperatura do injetor foi mantida a 250°C. Os compostos eluídos da coluna cromatográfica foram ionizados por impacto de elétrons a 70 eV. A fonte de ionização foi mantida a 230° C e o quadrupolo a 150°C. Os espectros de massa foram obtidos no modo *scan* com velocidade de 0,5 *scan* por segundo, com faixa de varredura de *m/z* de 35 a 350. Uma alíquota de 1 µL da amostra de voláteis florais foi injetada com o injetor no modo *split* de 1:30.

Os compostos foram identificados por meio da análise dos espectros de massa de cada pico cromatográfico, comparação com padrões autênticos e cálculo de índices de retenção. Foram calculados os índices de retenção linear dos componentes dos odores florais utilizando-se os tempos de retenção de cada composto e os tempos de retenção de n-alcenos (C 9 a C 30) analisados sob as mesmas condições. Os valores calculados foram comparados com os índices de retenção publicados na literatura.

A porcentagem relativa para os compostos presentes no odor floral foi obtida com a injeção uma alíquota do extrato em um cromatógrafo gasoso (Thermo Trace GC Ultra, Thermo Scientific, Milan, Italy) equipado com coluna VB-5 (30 m de comprimento, 0.25 mm de diâmetro interno, 0.25 µm de espessura do filme, ValcoBond), detector de ionização por chama (FID) e injetor *split/splitless*. A programação de temperatura no cromatógrafo gasoso foi a mesma utilizada nas análises por CGEM, com *split* de 1:10.

### 5.2.5 Testes eletrofisiológicos

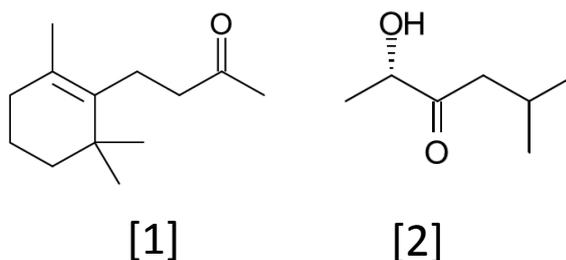
A resposta eletrofisiológica de antenas de *C. cearae* aos voláteis emitidos pelas inflorescências de *T. ulei* foi investigada por meio de cromatografia gasosa acoplada a um detector eletroantenográfico (GC-EAD). O sistema de GC-EAD utilizado consiste em um cromatógrafo gasoso (Thermo Trace GC Ultra, Thermo Scientific, Milan, Italy) equipado com um detector de ionização por chama (FID), coluna VB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, ValcoBond) e injetor *split/splitless*, acoplado a um sistema de EAD (Syntech, Kirchzarten, Germany). Condições de análise: temperatura inicial do forno foi de 60°C (mantida por 1 min), programada para aumentar até 200°C a uma taxa de 7°C/min; a temperatura final foi mantida por 2 minutos. O injetor, o detector e a linha de transferência para o EAD foram mantidos a 200°C e nitrogênio foi usado como gás de arraste, a fluxo constante de 1 mL/min. A saída do EAD foi colocada em um fluxo de ar limpo e umidificado direcionado à antena montada. Os testes eletroantenográficos foram conduzidos com o injetor no modo *split* com valores variáveis de divisão (de 1:10 até 1:50).

A preparação das antenas de *C. cearae* seguiu o procedimento descrito no tópico 4.2.5 (página 54). Foram testadas por GC-EAD amostras de odores florais obtidas por *headspace* de inflorescências de *T. ulei* extraídas por 150 minutos.

### 5.2.6 Testes comportamentais em tubo em Y

Os testes comportamentais com os besouros *C. cearae* foram realizados por meio de testes de dupla escolha em um olfatômetro em Y, utilizando o mesmo procedimento descrito no tópico 4.2.7 (página 57).

Foram realizados testes comportamentais com o intuito de observar a resposta de machos e fêmeas de *C. cearae* aos voláteis florais de *T. ulei* e aos dois compostos majoritários presentes no odor: diidro-β-ionona (SAFC, pureza >90% W36,260-3) [1] e (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona (sintetizado em laboratório (Maia et al., 2013b) [2], bem como a uma mistura destes dois compostos em diferentes proporções (ver abaixo). Esperou-se dois minutos para a completa evaporação do solvente antes de introduzir os papéis impregnados com voláteis dentro do tubo em Y.



Alíquotas de 4  $\mu\text{L}$  do headspace das inflorescências de *T. ulei* foram testadas contra 4  $\mu\text{L}$  de hexano para verificar a resposta de *C. cearae* ao odor floral. Ensaio com diidro- $\beta$ -ionona foram realizados com 2  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 0,00419 g deste composto em 1mL de hexano. Nestes testes, 2  $\mu\text{L}$  de hexano foram usados como controle. Para os testes com (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona, uma alíquota 2  $\mu\text{L}$  de uma solução com concentração de 0,00384 g/mL foi usada contra 2  $\mu\text{L}$  de hexano (controle). Os ensaios com a mistura binária dos compostos majoritários de *T. ulei* foram realizados em diferentes proporções. O primeiro teste [M1] foi realizado com alíquotas de 2  $\mu\text{L}$  de solução de cada composto isolado contra 4  $\mu\text{L}$  de hexano (controle). O segundo teste [M2] foi feito com 1  $\mu\text{L}$  da solução de diidro- $\beta$ -ionona e 3  $\mu\text{L}$  de solução de (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona. O terceiro teste [M3] com mistura binária foi realizado com alíquotas de 5  $\mu\text{L}$  de cada solução. Para este teste foi usado 10  $\mu\text{L}$  de hexano para o controle. No quarto teste com mistura binária [M4], foi usada uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de solução de diidro- $\beta$ -ionona juntamente com 2  $\mu\text{L}$  de solução de (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona. O volume total de 12  $\mu\text{L}$  de hexano foi aplicado ao papel colocado no braço controle. Os testes foram conduzidos entre 10:00 e 18:00 horas.

### 5.2.7 Análises estatísticas

Os testes estatísticos foram feitos com o programa estatístico Bioestat 5.3. O teste exato de Fisher foi usado para verificar se havia diferença nos padrões de resposta de machos e fêmeas aos estímulos testados. O teste binomial foi usado para determinar se a distribuição das respostas dos besouros foi significativamente diferente de uma distribuição 1:1. Em relação aos testes com misturas binárias, foi aplicado teste estatístico apenas a [M3] e [M4], devido ao baixo número de repetições de [M1] e [M2]. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Os besouros que não responderam durante o bioensaio em tubo em Y não foram incluídos nas análises.

## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Odor floral de *Taccarum ulei*

Os voláteis florais liberados durante a fase termogênica da antese de uma inflorescência de *Taccarum ulei* foram amostrados através da técnica de *headspace* dinâmico durante 150 minutos. Os componentes majoritários encontrados no odor floral desta planta são o composto alifático (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona que representa 80,94 % dos componentes voláteis, e diidro- $\beta$ -ionona, que representa 10,53 % da composição (Tabela 5.1). Foi encontrado também um terceiro composto, cuja estrutura está ainda em fase de elucidação, que representa 6,24% da composição do odor floral.

**Tabela 5.1** Composição do odor floral de *Taccarum ulei* (Araceae) na fase termogênica.

Compostos	IR calc	IR lit	%
Heptano-2,3-diona	833	-	0,65
( <i>S</i> )-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona	949	*	<b>80,94</b>
Diidro- $\beta$ -ionona	1448	*	<b>10,53</b>
Diidro- $\beta$ -ionol	1450	1449 <sup>1</sup>	0,60
Composto não identificado (CNI) ( <i>m/z</i> 95, 68, 81)	1577	-	6,24
Compostos minoritários não identificados			1,04

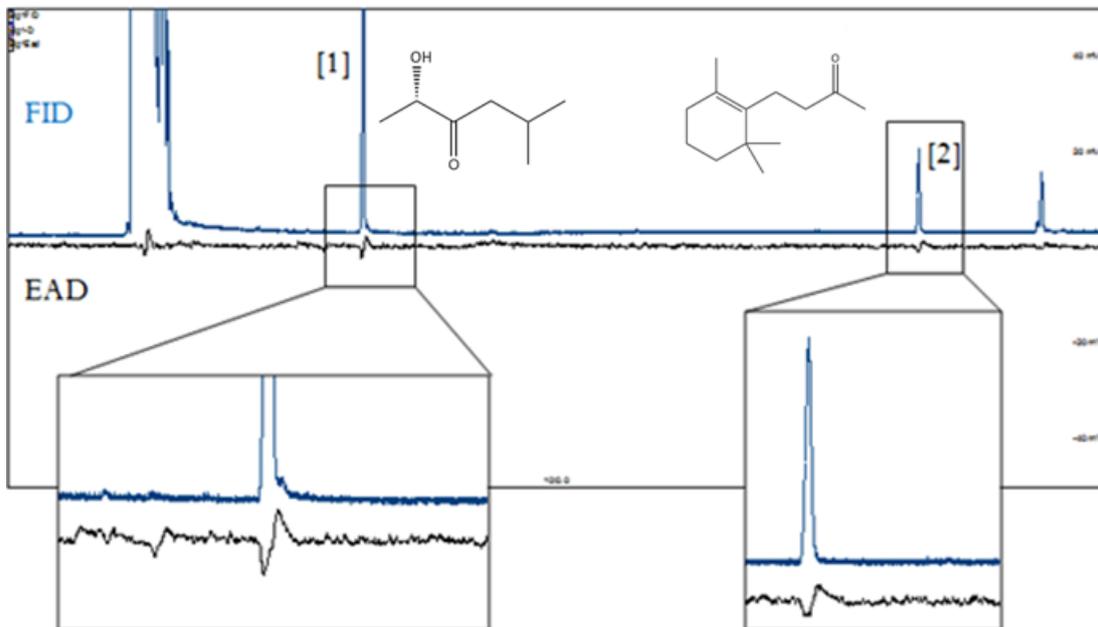
\*Compostos identificados por comparação com padrões;

<sup>1</sup> Andriamaharavo, 2014

### 5.3.2 Respostas eletrofisiológicas obtidas por GC-EAD

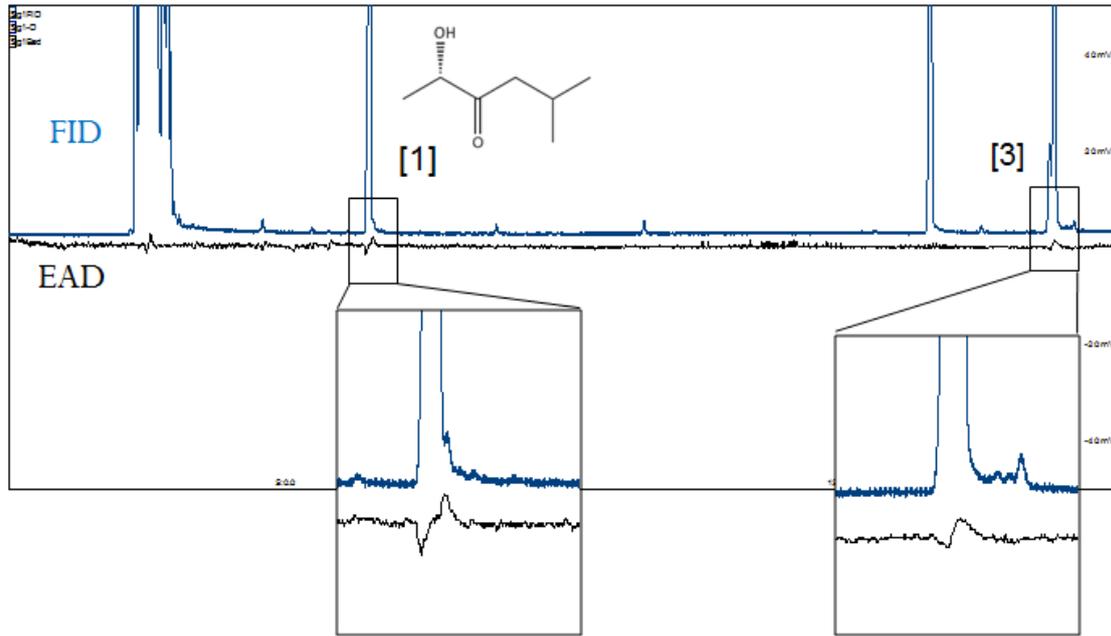
Foram montadas antenas de besouros machos e fêmeas de *C. cearae* para os testes eletrofisiológicos em GC-EAD, realizados com amostras de odores florais de *T. ulei*. Besouros machos e fêmeas responderam aos compostos majoritários liberados durante a termogênese: (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona, diidro- $\beta$ -ionona e o composto ainda não identificado (CNI). A intensidade das respostas para cada composto variou de indivíduo para indivíduo e de acordo com a concentração dos compostos (*split* utilizado na corrida cromatográfica). Em testes preliminares realizados com o injetor do cromatógrafo em modo *splitless*, as antenas de *C. cearae* não apresentaram resposta. Respostas mais expressivas para os componentes majoritários foram observadas em corridas com *split* 1:50 (Figura 5.2), com amplitude de

resposta variando de 100 a 600  $\mu\text{V}$  para (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona e de 80 a 360  $\mu\text{V}$  para diidro- $\beta$ -ionona.



**Figura 5.2:** Resposta eletrofisiológica de uma antena de *Cyclocephala cearae* (Melolonthidae; Dynastini) macho aos compostos 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona [1] (-500  $\mu\text{V}$ ) e diidro- $\beta$ -ionona [2] (-240  $\mu\text{V}$ ) presentes em uma amostra de *headspace* dinâmico obtido por aeração por 150 minutos de inflorescências de *Taccarum ulei* durante a fase termogênica do primeiro dia da antese. Escala de EAD 10 mV, *Split* 1:50.

Respostas nítidas para o terceiro composto majoritário CNI foram observadas para corridas cromatográficas realizadas com *split* 1:10, com amplitude de resposta para este composto variando de 100 a 540  $\mu\text{V}$  (Figura 5.3).



**Figura 5.3:** Resposta eletrofisiológica de uma antena de *Cyclocephala cearae* (Melolonthidae; Dynastini) macho a 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona [1] ( $-260 \mu\text{V}$ ) e para o terceiro composto majoritário CNI [3] ( $-100 \mu\text{V}$ ) presentes em uma amostra de *headspace* dinâmico obtido por aeração por 150 minutos de inflorescências de *T. ulei* durante a fase termogênica do primeiro dia da antese. Escala do EAD 10 mV, *Split* 1:10

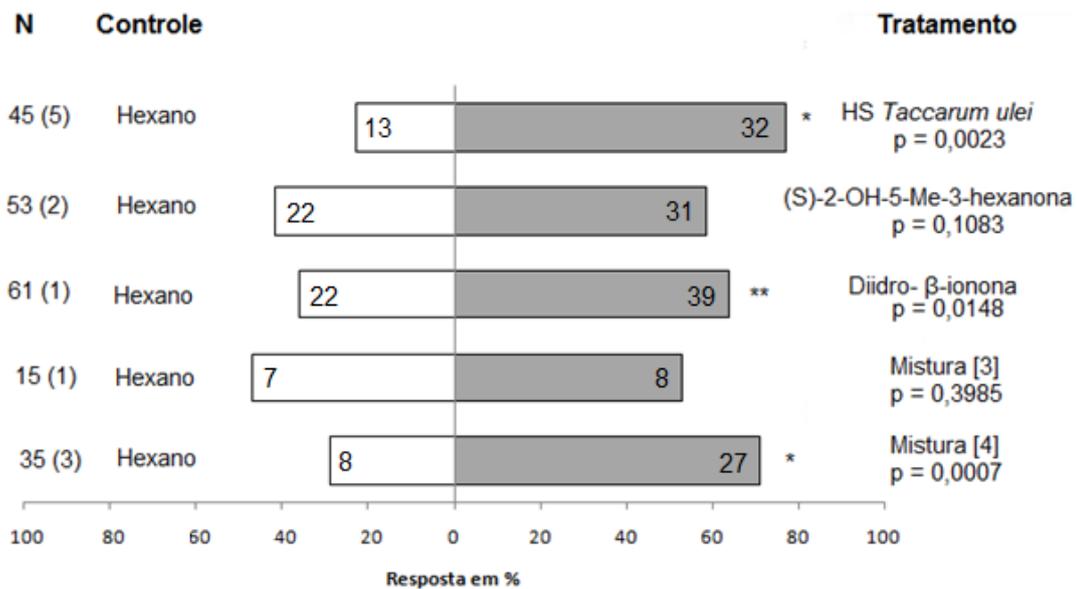
### 5.3.3 Respostas para os testes em olfatômetro em Y

Durante os ensaios comportamentais em tubo em Y, os besouros *C. cearae* foram submetidos ao odor floral de *T. ulei* e aos dois compostos majoritários diidro- $\beta$ -ionona e (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona tanto isoladamente quanto em misturas binárias. Testes preliminares com os besouros *C. cearae* indicaram não haver diferença de atividade entre o período da manhã, tarde e noite. Os bioensaios comportamentais foram conduzidos entre 10:00 e 18:00 horas. No interior do tubo, os besouros movimentavam as antenas com as lamelas abertas, buscando a fonte de odor. Assim como observado para os besouros *C. celata* (tópico 4.3.3, página 62), o número de machos foi maior do que o número de fêmeas, refletindo a proporção dos sexos encontrada no interior das inflorescências. Apesar desta diferença, o teste exato de Fisher mostrou que a resposta comportamental de machos e fêmeas aos estímulos testados foi similar (odor floral  $p = 0,4666$ ; diidro-  $\beta$ -ionona  $p = 0,9999$ ; (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona  $p = 0,7456$ ; mistura [M3]  $p = 1,000$ ; mistura [M4]  $p = 0,6851$ ). Desta maneira, as respostas de machos e fêmeas aos semioquímicos foram somadas para a execução do teste binomial (Tabela 5.2).

**Tabela 5.2** Respostas de besouros *Cyclocephala cearae* (Melolonthidae; Dynastini) ao odor floral de *Taccarum ulei* (Araceae), e aos compostos majoritários nos bioensaios em tubo em Y.

Tratamento	Resposta (n° de indivíduos)			Total
	Teste	Controle	Não responderam	
<b>HS <i>Taccarum ulei</i></b>	32	13	5	50
<b>Diidro- <math>\beta</math>-ionona</b>	39	22	1	62
<b>(S)-2-OH-5-Me-3-hexanona</b>	31	22	2	55
<b>Mistura [M1]</b>	6	4	0	10
<b>Mistura [M2]</b>	1	3	3	7
<b>Mistura [M3]</b>	8	7	1	16
<b>Mistura [M4]</b>	27	8	3	38

O odor floral de *T. ulei* foi mais atrativo para os besouros *C. cearae* do que o controle negativo ( $p = 0,0023$ ). A diidro- $\beta$ -ionona isolada também se mostrou atrativa para os besouros nos bioensaios realizados ( $p = 0,0148$ ). No teste realizado com (S)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona não houve diferença significativa entre os besouros que escolheram o braço teste e o braço controle ( $p = 0,1083$ ) (Figura 5.4).



**Figura 5.4:** Respostas (em %) de besouros *Cyclocephala cearae* (Melolonthidae; Dynastini) aos estímulos testados em bioensaios de dupla escolha em olfatômetro em Y. Os números à esquerda do gráfico mostram a quantidade de besouros que responderam em cada teste, enquanto que o número entre parênteses mostram aqueles que não responderam. Os números dentro das barras indicam quantos besouros escolheram o tratamento ou o controle em cada teste. \* Indica os testes significativos para  $p < 0,01$  e \*\* indica o teste significativo para  $p < 0,05$  nos testes binomiais. Em todos os bioensaios, hexano foi usado como controle.

Foi testada também a atratividade da mistura binária contendo os dois compostos majoritários presentes no odor floral de *T. ulei*. Foram testados quatro proporções diferentes dos componentes na busca por uma mistura que se mostrasse atraente para os besouros. Nos dois primeiros testes com a mistura [M1] e [M2] não foi observada nenhuma tendência de atratividade. No teste [M3] não houve diferença significativa entre os besouros que escolheram o braço teste ou controle. Baseado nos resultados obtidos nos testes anteriores, para a mistura [M4] foi adicionada uma quantidade bem maior de diidro-β-ionona (10 μL) em relação a (S)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona (2 μL). Essa mistura mostrou-se altamente atrativa ( $p = 0,0007$ ).

## 5.4 DISCUSSÃO

O odor floral de *T. ulei* é composto principalmente por (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona e diidro- $\beta$ -ionona que totalizam mais de 90% da composição do odor floral. Os mesmos compostos majoritários são encontrados em *Philodendron acutatum*, uma arácea simpátrica que floresce no mesmo período que *T. ulei*. A composição química do odor floral de *P. acutatum* difere de *T. ulei* na proporção dos compostos majoritários. Em *P. acutatum* a diidro- $\beta$ -ionona é o composto predominante (Maia et al., 2010). Outra diferença encontrada no odor das duas aráceas é a presença do CNI no aroma de *T. ulei*. Maia et al. (2013a) estudaram a composição dos odores liberados durante a termogênese de três inflorescências de *T. ulei* coletadas na mesma população estudada neste trabalho. Nestas amostras, obtidas com a técnica de *headspace* dinâmico por 30 minutos, foram identificados 13 compostos voláteis, sendo os componentes majoritários (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona ( $76,39 \pm 11,96$  %) e diidro- $\beta$ -ionona ( $19,85 \pm 12,05$  %).

Nos testes eletrofisiológicos realizados com *C. cearae* observou-se que esta espécie respondeu aos dois compostos majoritários presentes no odor floral de *T. ulei*, (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona e diidro- $\beta$ -ionona, e ao CNI. Em testes comportamentais observou-se a quimiotaxia dos besouros para o odor floral de *T. ulei*, para a diidro- $\beta$ -ionona isolada e para a mistura binária de (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona e diidro- $\beta$ -ionona na proporção [M4]. Os testes comportamentais mostraram que apesar de a antena detectar ambos compostos majoritários no teste eletrofisiológico, a diidro- $\beta$ -ionona parece ser mais importante no direcionamento da resposta comportamental. Assim como ocorreu para os besouros da espécie *C. celata* (Capítulo 3), os resultados obtidos em laboratório para *C. cearae* foram diferentes dos observados em campo, com captura de indivíduos em armadilhas contendo apenas (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona, enquanto que armadilhas contendo apenas diidro- $\beta$ -ionona não capturaram nenhum besouro (Maia et al., 2013b). Entre os fatores que podem estar relacionados com esta diferença nas respostas em laboratório e em campo pode-se considerar: 1) As diferenças na volatilidade dos dois compostos (2-hidroxi-5-metil-3-hexanona: ponto de ebulição de 172,21°C a 760,00 mm/Hg e pressão de vapor de 0,426 mm/Hg a 25,00 °C; diidro- $\beta$ -ionona: ponto de ebulição de 261,00 a 262,00 °C a 760,00 mm/Hg e pressão de vapor de 0,010 mm/Hg a 25,00 °C) que implicam maior dispersão de 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona em relação a diidro- $\beta$ -ionona em campo; em laboratório, no espaço reduzido do tubo em Y e com fluxo de ar direcional, as diferenças na volatilidade não seriam tão notáveis. 2) As diferenças

na afinidade dos dois compostos ao solvente utilizado. Na preparação das armadilhas foi utilizado óleo de parafina, uma mistura de hidrocarbonetos de alto peso molecular de caráter apolar para dissolver os compostos. Devido a sua estrutura química (cadeia alquílica mais longa), a diidro- $\beta$ -ionona tem maior afinidade pelo solvente utilizado, o que aumenta a retenção desta molécula e diminui sua volatilização, quando comparado à 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona, que apresenta maior caráter polar devido à presença da hidroxila.

O besouro *C. celata* que ocorre na mesma região é o polinizador efetivo em populações de *P. acutatum* e também poliniza *T. ulei* e outra arácea simpátrica *Caladium bicolor*. Esta última espécie possui um conjunto de voláteis florais diferente de *P. acutatum* e *T. ulei*, com predomínio de 4-metil-5-viniltiazol (36,25 %) e compostos aromáticos 1,3,5-Trimetoxibenzeno (31,49 %) e salicilato de metila (15,56 %) (Maia et al., 2012). *C. cearae*, no entanto, é polinizador de *T. ulei* apenas, não sendo encontrado em inflorescências de *P. acutatum* ou *C. bicolor*. O CNI, ativo nos testes eletrofisiológicos, talvez seja importante na resposta de *C. cearae* ao odor floral de *T. ulei*, porém a ausência de diferença entre a atratividade do odor floral de *T. ulei* e da mistura binária dos componentes majoritários [M4] no teste em olfatômetro, sugere que outros fatores além dos sinais químicos desempenhem um papel importante na especialização do besouro *C. cearae* à arácea *T. ulei*. Sinais visuais também podem desempenhar um papel importante nas interações entre besouros Cyclocephalini e suas plantas hospedeiras. Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger (1991) mostraram que besouros da espécie *Erioscelis emarginata* são normalmente atraídos a longa distância por compostos orgânicos voláteis produzidos pelas inflorescências e orientados, a curta distância por estímulos visuais, como a coloração da espata e espádice das inflorescências.

## 5.5 CONCLUSÕES

As respostas eletrofisiológicas e comportamentais de *Cyclocephala cearae* ao odor floral de *Taccarum ulei* mostram que os besouros reconhecem os semioquímicos das inflorescências desta arácea e que estes sinais olfativos são suficientes para desencadear a resposta comportamental independentemente de outros sinais florais.

## **6 RESPOSTA ELETROFISIOLÓGICA DE *ERIOSCELIS EMARGINATA*, *CYCLOCEPHALA FORSTERI* E *C. CEARAE* (MELOLONTHIDAE; DYNASTINAE; CYCLOCEPHALINI) A COMPOSTOS PRESENTES EM PLANTAS CANTARÓFILAS**

### **6.1 INTRODUÇÃO**

Voláteis florais são importantes na atração de polinizadores nos sistemas de polinização mutualísticos (Dobson, 2006). Em ecossistemas tropicais e subtropicais, a cantarofilia tem grande importância em assegurar o sucesso reprodutivo em muitas espécies de angiospermas (Bernhardt, 2000). Besouros da tribo Cyclocephalini (Dynastinae; Melolonthidae) são polinizadores conhecidos em muitas espécies de Araceae, Arecaceae, Annonaceae, Nymphaeaceae, Cyclanthaceae e Magnoliaceae (Beach, 1982; Dieringer et al., 1999; Ervik e Knudsen, 2003; Ervik et al., 1999; Gottsberger, 1999; Maia et al., 2012; Moore e Jameson, 2013).

Os besouros podem ser atraídos a longa distância por voláteis florais produzidos pelas inflorescências, que liberam uma grande quantidade de compostos orgânicos voláteis durante a termogênese floral (Seymour e Schultze-Motel, 1997). Durante os eventos de termogênese, os odores florais são tão intensos que podem ser percebidos pelo nariz humano a distâncias superiores a 10 m. A liberação dos voláteis coincide com o pico de atividade dos besouros que voam em direção às inflorescências e utilizam as câmaras florais como sítios de agregação e acasalamento. De acordo com Dötterl et al. (2012), a grande quantidade de odores liberados por inflorescências polinizadas por besouros dinastíneos se deve a três fatores: 1) o tamanho grande das inflorescências ou flores, 2) a ocorrência de termogênese floral, o que favorece a síntese e volatilização dos compostos produzidos, e 3) uma possível preferência de besouros da tribo Cyclocephalini a plantas fortemente perfumadas. Outros grupos de polinizadores noturnos, como mariposas e morcegos, também são atraídos por compostos voláteis em altas concentrações (Dobson, 2006).

Dentro da família das aráceas, o gênero neotropical *Philodendron* é de particular interesse devido a sua grande diversidade ( $\geq 500$  espécies) (Mayo et al., 1997). A cantarofilia neste gênero é bem difundida e muitas das características das inflorescências de *Philodendron* indicam correlação com besouros Cyclocephalini, como liberação de intenso aroma floral nos horários de pico de atividade dos besouros, termogênese, inflorescências em forma de funil que

servem como câmara de agregação para os besouros e recompensa alimentar na forma de flores estéreis e exudados florais (Bernhardt, 2000; Gibernau e Barabé, 2002; Thien et al., 2009). Diversas espécies de besouros dos gêneros *Cyclocephala* e *Erioscelis* são responsáveis pela polinização em *Philodendron* (Bernhardt, 2000; Moore e Jameson, 2013; Schatz, 1990). O besouro *Erioscelis emarginata* (Melolonthidae; Dynastinae; Cyclocephalini) é polinizador em quatro espécies deste gênero: *Philodendron selloum*, *P. mello-barretoanum* (Dötterl et al., 2012), *P. bipinnatifidum* (Gottsberger et al., 2013) e *P. adamantinum* (Pereira et al., 2014).

Os voláteis florais também podem regular as interações entre plantas e insetos florívoros, que consomem os tecidos florais sem realizar a polinização. Besouros adultos da espécie *Cyclocephala forsteri* (Melolonthidae; Dynastinae; Cyclocephalini) já foram registrados atacando inflorescências de *Acrocomia aculeata* (Arecaceae), palmeira com potencial para a produção de óleo e biodiesel, popularmente conhecida como macaúba. Os besouros se alimentam dos tecidos florais, causando a queda dos botões e, conseqüentemente, redução da quantidade de frutos no cacho (Oliveira e Ávila, 2011). As larvas de *C. forsteri* vivem no solo e se alimentam de sementes e de raízes de plantas e, juntamente com larvas de espécies das subfamílias Dynastinae, Melolonthinae, Rutelinae e Cetoniinae (Melolonthidae), são conhecidas como coró (Diez-Rodríguez et al., 2015). As larvas de *C. forsteri* podem ser encontradas no solo de áreas cultivadas com soja em Mato Grosso do Sul (Santos et al., 2007).

Avaliações da resposta eletrofisiológica de antenas de besouros Melolonthidae para compostos provenientes de plantas são raros. Os estudos são concentrados em espécies fitófagas e polífagas (especialmente das subfamílias Melolonthinae e Rutelinae) de importância econômica e normalmente limitados a *screenings* de compostos sintéticos, com o objetivo de desenvolver iscas e armadilhas eficientes para coleta dos insetos (Khbaish, 2010; Larsson et al., 2003; Leal, 1998; Ruther et al., 2000; Vuts et al., 2010, 2014). Estudos de GC-EAD de extratos biológicos, por outro lado, têm sido usados quase que exclusivamente para a identificação de componentes ativos em misturas feromonais (Leal et al., 1992, 1997; Yarden et al., 1996). Esta técnica é uma ferramenta muito importante no estudo de semioquímicos, já que permite avaliar compostos ativos dentro de extratos complexos, permitindo a seleção de atraentes em potencial antes da realização de bioensaios em campo. A técnica também é muito usada em investigações de feromônios (Zarbin et al., 1999).

Uma das possíveis razões para que o uso de GC-EAD não seja tão difundido nos estudos de semioquímicos em Melolonthidae é a dificuldade de montagem da antena lamelada, típica deste grupo de besouros. Para que a antena gere os sinais elétricos que são interpretados como resposta aos compostos que eluem do GC, as sensilas olfativas da antena devem estar recebendo

o ar umedecido carreando os compostos. Nas antenas de Melolonthidae as sensilas estão localizadas na superfície interna das lamelas. Ao explorar o ambiente, os besouros abrem as lamelas expondo as sensilas ao ar circundante e movimentam as antenas de acordo com a direção da fonte de odor. Quando se sentem ameaçados, os besouros fecham as lamelas e retraem as antenas, guardando-as na região lateral inferior da cabeça. Quando a antena é retirada de um espécime para a preparação do eletroantenograma, as lamelas encontram-se fechadas, sendo preciso abri-las de forma mecânica para a realização dos testes. Leal et al. (1992) realizaram o primeiro teste de GC-EAD com uma antena lamelada, utilizando o besouro fitófago *Anomala cuprea* (Melolonthidae, Rutelinae). Para a montagem da antena, os autores desenvolveram um aparato em acrílico acoplado à saída de ar do GC-EAD que permitiu manter as lamelas da antena abertas durante a corrida cromatográfica. O mesmo procedimento foi adotado por Yarden et al. (1996), que encontrou um composto eletrofisiologicamente ativo para machos de *Maladera matrida* Argaman (Melolonthidae, Melolonthinae) em extratos de fêmeas desta espécie.

Neste trabalho, foram estudadas as respostas eletrofisiológicas de *E. emarginata*, *C. forsteri* e *C. cearae* a compostos descritos em plantas cantarófilas e atraentes para besouros. Foi testada também a resposta das antenas de *E. emarginata* ao odor floral de *P. mello-barretoanum* e a resposta de antenas de *C. forsteri* aos voláteis de *A. aculeata*, respectivas plantas hospedeiras das duas espécies em questão.

## 6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.2.1 Coleta de besouros

Os besouros da espécie *Erioscelis emarginata* foram coletados manualmente em inflorescências de *Philodendron mello-barretoanum* localizadas no Horto Botânico da Universidade Católica de Brasília, Taguatinga - DF (15°86' S; 48°03' W). Indivíduos adultos de *C. forsteri* foram coletados diretamente em inflorescências de *Acrocomia aculeata* durante o período de antese, entre as 18h00 e 21h00. O sítio de coleta foi o município de Campo Grande-MS (20°46' S; 54°63' W).

As áreas de coleta fazem parte do domínio do Cerrado, bioma característico da região central do Brasil. O clima nesta região é sazonal, com fortes chuvas nos meses de verão (de outubro a março) e prolongado período seco durante o inverno. O Cerrado é a savana tropical

mais diversificada do mundo, com uma grande diversidade de habitats incluindo formações campestres e florestais, vasta riqueza de espécies e elevado índice de endemismo. A vegetação tem como característica a presença de árvores de médio porte, retorcidas, de folhas ásperas e casca rugosa (Klink e Machado, 2005).

Os besouros da espécie *C. cearae* foram coletados em inflorescências de *Taccarum ulei* no município de Igarassu - PE (7°73'S; 34°95'W) (tópico 5.2.1, página 72).

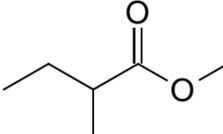
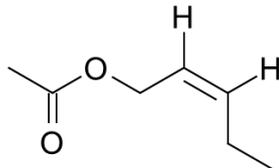
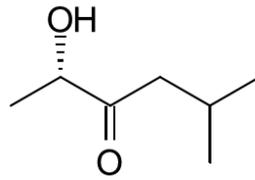
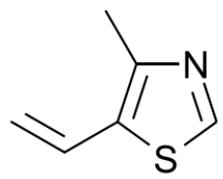
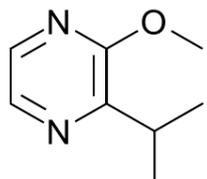
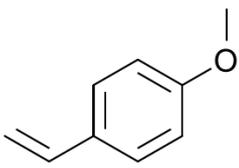
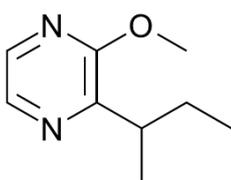
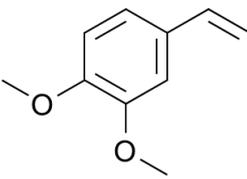
Os besouros coletados foram enviados ao Laboratório de Ecologia Química da UFPE, onde foram mantidos de acordo com a metodologia descrita no tópico 4.2.4 (página 54).

### 6.2.2 Testes eletroantagráficos GC-EAD

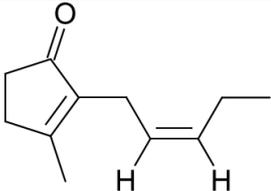
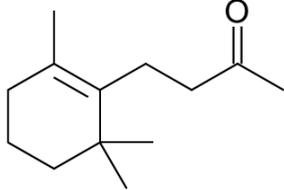
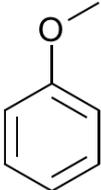
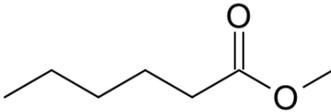
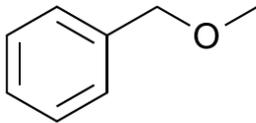
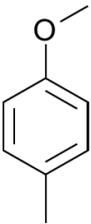
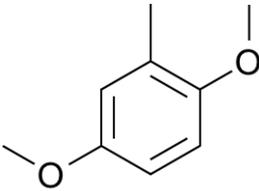
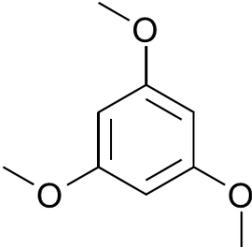
Os ensaios eletroantagráficos com machos e fêmeas de *Cyclocephala forsteri*, *C. cearae* e *Erioscelis emarginata* foram realizados de acordo com a metodologia descrita no no tópico 4.2.5 (página 54). Para os besouros *E. emarginata* os testes de GC-EAD foram conduzidos com o odor floral de *Philodendron mello-barretoanum* (Araceae) e para *C. forsteri* foi testada a resposta eletroantagráfica aos voláteis presentes em uma inflorescência de *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). Os voláteis florais foram coletados *in situ* por Artur C. D. Maia com a técnica de *headspace* dinâmico descrita em Maia et al., 2010. A análise cromatográfica dessas amostras foi realizada seguindo a mesma metodologia descrita no tópico 4.2.3 (página 53).

Foram testados para as três espécies de besouro misturas contendo compostos descritos em plantas cantarófilas e compostos com atratividade comprovada para diferentes espécies de Coleoptera (Tabela 6.1). Os compostos na tabela estão listados de acordo com a ordem de eluição nas análises cromatográficas. Os compostos de [1] a [10] fazem parte da **mistura I**, enquanto que os compostos de [11] a [16] fazem parte da **mistura II**. Cada mistura foi preparada adicionando-se 10 µL de composto puro em um frasco contendo 1 mL de hexano bidestilado, grau GC.

**Tabela 6.1** Compostos sintéticos utilizados na preparação de misturas para os ensaios eletroantegráficos.

N	Composto	Estrutura	Especificação	Artigo
[1]	2-metilbutanoato de metila		Sigma-Aldrich Pureza $\geq 99$ %	(Gottsberger et al., 2012)
[2]	(Z)-pent-2-en-1-il-acetato		Sintetizado em laboratório (Maia, A.C.D.)	Presente trabalho
[3]	(S)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona		Sintetizado em laboratório	(Maia et al., 2013)
[4]	4-metil-5-vinil-tiazol		Sigma-Aldrich Pureza $\geq 97$ %	(Maia et al., 2012)
[5]	2-isopropil-3-metoxipirazina		Sigma-Aldrich Pureza $\geq 97$ %	(Ervik et al., 1999)
[6]	4-metoxi-estireno (4-vinilanol)		Sigma-Aldrich Pureza $\geq 97$ %	(Dötterl et al., 2012)
[7]	2-metoxi-3-(1-metilpropil)-pirazina		Sigma-Aldrich Pureza $\geq 98$ %	(Ervik et al., 1999)
[8]	3,4-dimetoxi-estireno		Sigma-Aldrich	(Dötterl et al., 2012)

---

[9]	(Z)-jasmona		Sigma-Aldrich Pureza $\geq 90$ %	(Dötterl et al., 2012)
[10]	Diidro- $\beta$ -ionona		SAFC, Pureza > 90%	(Pereira et al., 2014)
[11]	Anisol		Sigma-Aldrich Pureza $\geq 99$ %	(Leal et al., 1996)
[12]	Caproato de metila		Sigma-Aldrich Pureza $\geq 99$ %	(Stensmyr et al., 2001)
[13]	Metoxi-metil-benzeno		Sigma-Aldrich Pureza $\geq 98$ %	(Marques et al., 2009)
[14]	4-metil-anisol		Sigma-Aldrich Pureza $\geq 99$ %	(Ervik et al., 1999)
[15]	2,5-dimetoxi-tolueno		Sigma-Aldrich Pureza $\geq 99$ %	(Ervik e Knudsen, 2003)
[16]	1,3,5-trimetoxi-benzeno		Sigma-Aldrich Pureza $\geq 99$ %	(Gibernau et al., 2003)

---

## 6.3 RESULTADOS

### 6.3.1 Composição dos odores florais

A composição do odor floral de *Philodendron mello-barretoanum* e de *Acrocomia aculeata* está descrita na tabela 6.2. O odor floral de *P. mello-barretoanum* tem como componente majoritário (*Z*)-jasmona, que representa 57,14 % da composição. O segundo composto mais expressivo nesta espécie é o (*Z*)-pent-2-en-1-il-acetato (17,30 %). O isômero (*Z*)-pent-1-en-3-il-acetato está presente em menor proporção (2,92 %). A classe dos aromáticos está representada por salicilato de metila (5,16 %) e acetato de benzila (0,31 %). Nesta espécie foram também encontrados alguns terpenóides, como (*E*)- $\beta$ -ocimeno e linalol. Em *A. aculeata* o benzenóide metoxilado 4-metil-anisol representou o composto mais abundante, perfazendo mais de 98% da composição do odor floral. Também foi encontrada nesta espécie a pirazina metoxilada 2-metoxi-3-(1-metilpropil)-pirazina.

**Tabela 6.2** Composição do odor floral em *Philodendron mello-barretoanum* (Araceae) [P.mel] e *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) [A.acu]

Compostos	IR calc	IR lit	%	
			[P.mel]	[A.acu]
<b>Alifáticos</b>				
(Z)-pent-1-en-3-il-acetato	847	*	2,92	0
(Z)-pent-2-en-1-il-acetato	917	*	17,30	0
3-hexen-1-ol-acetato	1007	1007/1009	0,47	0
Pentadecano	1499	*	0	0,13
<b>Benzenóides e fenilpropanóides</b>				
4-metil-anisol	1023	*	0	98,43
Acetato de benzila	1164	1162/1165	0,31	0
Salicilato de metila	1195	1193/1200	5,16	0
<b>Compostos contendo N</b>				
2-metoxi-3-(1-metilpropil)-pirazina	1096	*	0	1,28
<b>Terpenóides</b>				
$\beta$ -Mirceno	991	988/992	0,22	0
(E)- $\beta$ -ocimeno	1048	1044/1051	0,91	0
(Z)-óxido de Linalol	1087	1087/1072	0,18	0
Linalol	1099	1095/1100	0,40	0
6-etenildiidro-2,2,6-trimetil-2H-piran-3(4H)-ona	1106	1107/1109	0,16	0
<b>Outros compostos cíclicos</b>				
(Z)-Jasmona	1413	*	57,14	0
Ciclopentadieno $m/z$ 162, 133, 94	1307	**	14,03	0
<b>Compostos minoritários não identificados</b>			0,80	0,16

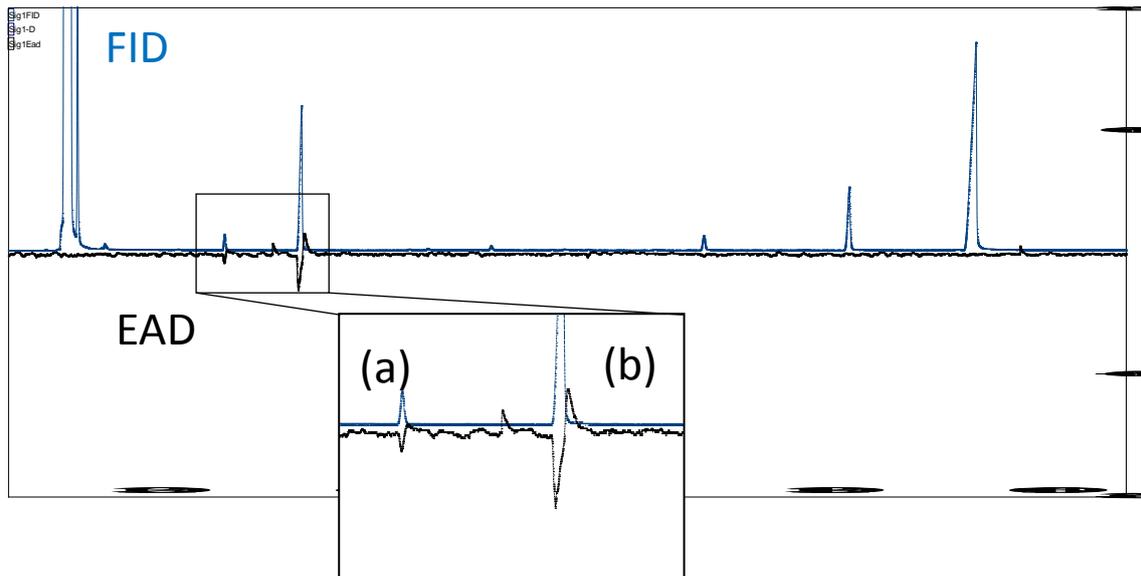
\*Compostos identificados por comparação com padrões

\*\* Composto identificado pelo grupo de pesquisa de prof. Dr Stefan Dötterl a partir de amostras de odor floral de *P. mello-barretoanum*.

### 6.3.2 Testes eletrofisiológicos

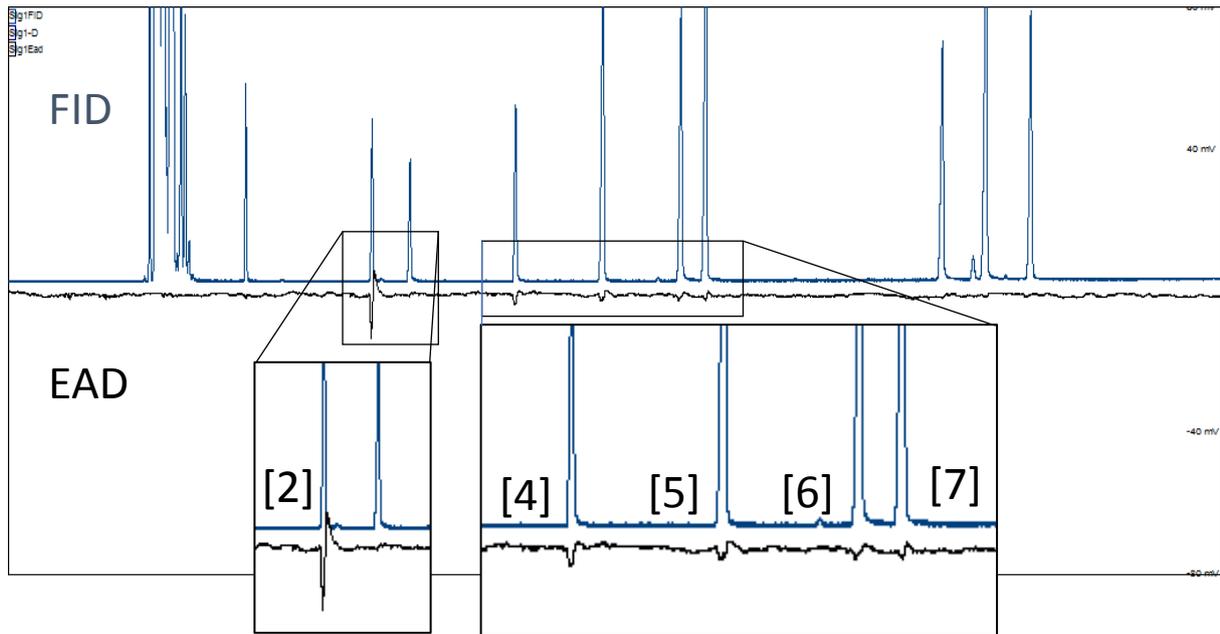
#### 6.3.2.1 *Erioscelis emarginata*

Antenas de machos e fêmeas de *E. emarginata* responderam a (Z)-pent-2-en-1-il-acetato e ao seu isômero (Z)-pent-1-en-3-il-acetato (Figura 6.1), mas não responderam ao composto majoritário (Z)-jasmona presente no odor floral de *P. mello-barretoanum*. A amplitude de resposta das antenas de *E. emarginata* variou de 280  $\mu$ V a 2,72 mV para (Z)-pent-2-en-1-il-acetato, e de 60 a 480  $\mu$ V para (Z)-pent-1-en-3-il-acetato.

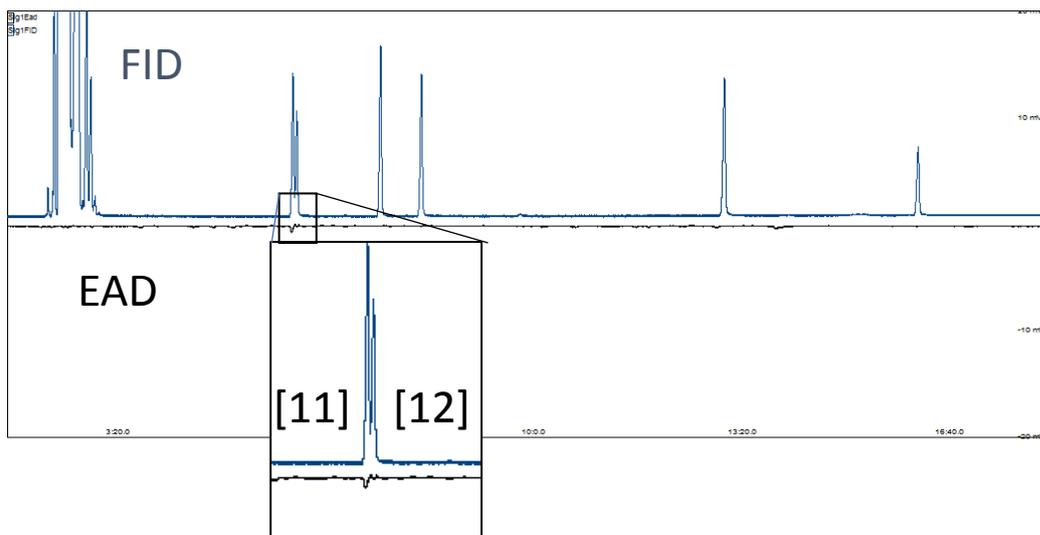


**Figura 6.1:** Resposta eletrofisiológica de antena de *Erioscelis emarginata* (macho) a (*Z*)-pent-1-en-3-il-acetato (a) e (*Z*)-pent-2-en-1-il-acetato (b) presentes em uma amostra de *headspace* dinâmico de inflorescência de *Philodendron mello-barretoanum* durante a fase termogênica do primeiro dia da antese. A amplitude de resposta a (a) neste ensaio foi de 2,72 mV, e a (b) de 480  $\mu$ V Escala do EAD 10 mV, *Split* 1:10.

Nos ensaios eletroantenográficos com a mistura I, foi observada resposta das antenas de *E. emarginata* a (*Z*)-pent-2-en-1-il-acetato (320  $\mu$ V a 1,46 mV), 4-metil-5-viniltiazol (60 a 380  $\mu$ V), a 2-isopropil-3-metoxipirazina (60 a 200  $\mu$ V), 4-metoxiestireno (120 a 240  $\mu$ V) e a 2-metoxi-3-(1-metoxipirazina) (60 a 160  $\mu$ V) (Figura 6.2). Nos experimentos com a mistura II, foi observada resposta das antenas de *E. emarginata* apenas ao anisol, com intensidades de resposta variando de 120 a 700  $\mu$ V (Figura 6.3). Apesar da baixa resolução cromatográfica entre os compostos anisol e caproato de metila, ficou evidente nas análises de GC-EAD que a resposta da antena refere-se apenas ao anisol.



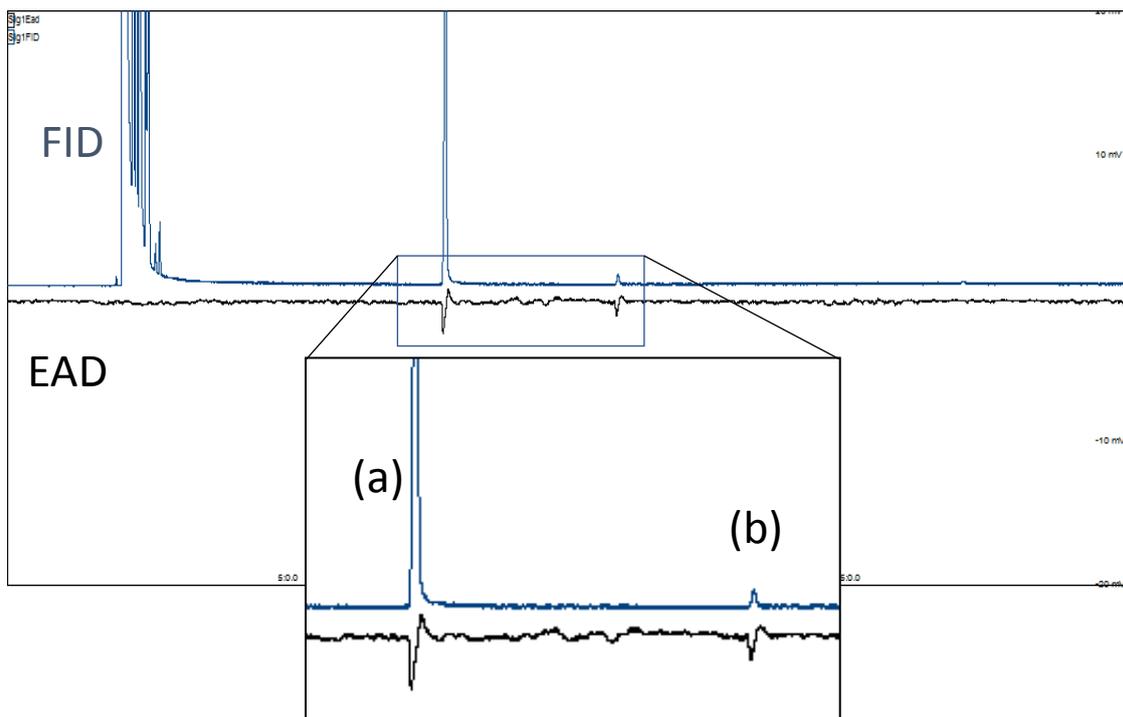
**Figura 6.2:** Resposta eletrofisiológica de antena de *Erioscelis emarginata* (fêmea) (*Z*)-pent-2-en-1-il-acetato [2], 4-metil-5-viniltiazol [4], 2-isopropil-3-metoxipirazina [5], 4-metoxiestireno [6] e 2-metoxi-3-(1-metoxipirazina) [7]. A amplitude de resposta aos compostos neste ensaio foi de: [2] 1,52 mV [4] 340  $\mu$ V, [5] 240  $\mu$ V [6] 160  $\mu$ V e [7] 100  $\mu$ V. Escala do EAD 20 mV, *Split* 1:100 (Os números em colchetes referem-se à numeração na Tabela 6.1)



**Figura 6.3:** Resposta eletrofisiológica de antena de *Erioscelis emarginata* (macho) a anisol [11]. A amplitude de resposta a [11] neste ensaio foi de 480  $\mu$ V. Escala do EAD 10 mV, *Split* 1:100. (Os números em colchetes referem-se à numeração na Tabela 6.1)

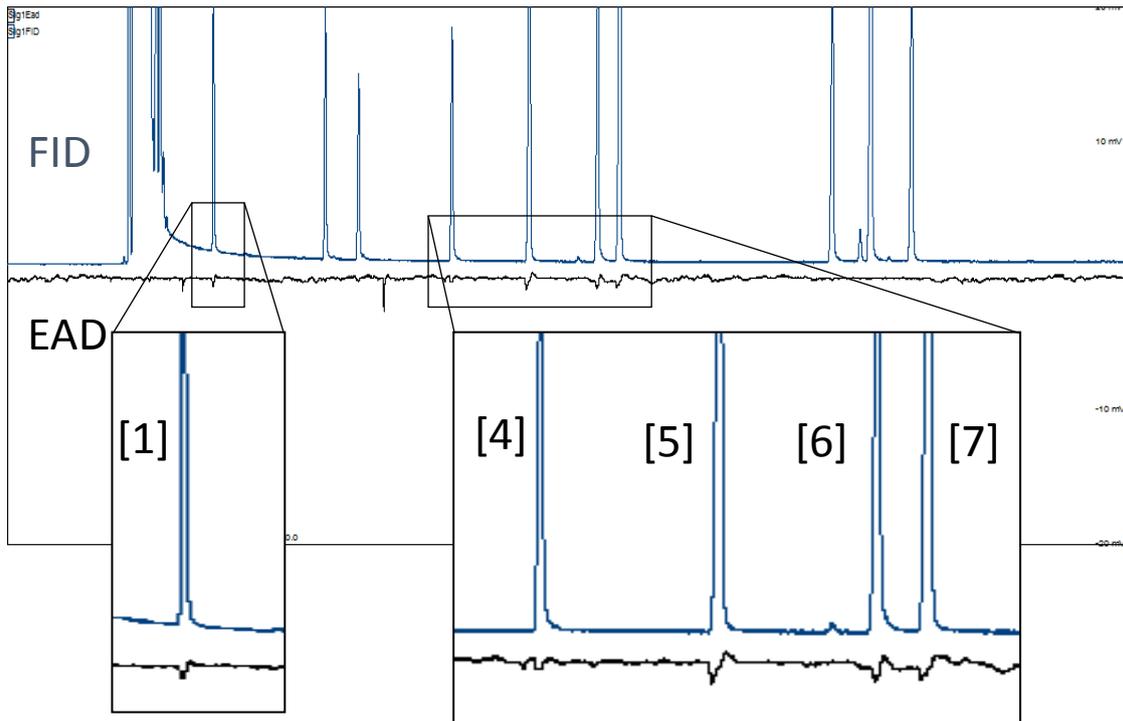
### 6.3.2.2 *Cyclocephala forsteri*

Antenas de machos e fêmeas de *C. forsteri* responderam ao composto majoritário presente no odor floral de *A. aculeata*, o 4-metil-anisol, e também ao componente minoritário 2-metoxi-3-(1-metilpropil)-pirazina (Figura 6.4). A amplitude de resposta das antenas desta espécie variou de 320  $\mu\text{V}$  a 2,18 mV para 4-metil-anisol, e de 120 a 720  $\mu\text{V}$  para 2-metoxi-3-(1-metilpropil)-pirazina.

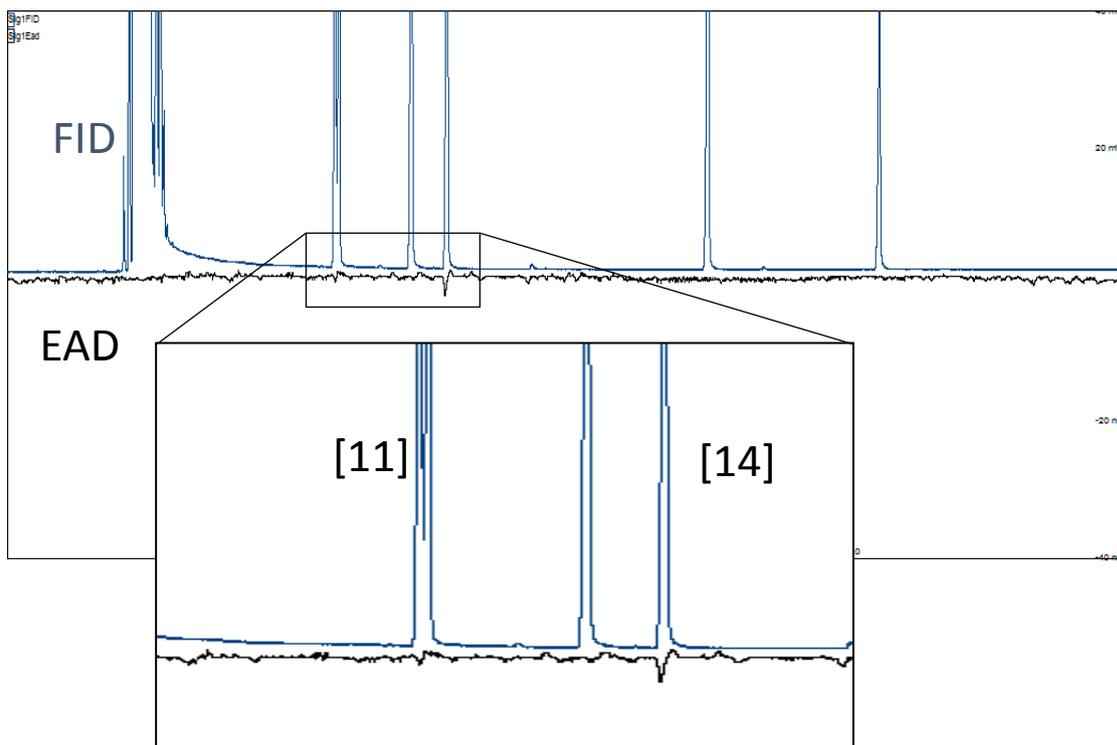


**Figura 6.4:** Resposta eletrofisiológica de antena de *Cyclocephala forsteri* fêmea a 4-metil-anisol (a) e 2-metoxi-3-(1-metilpropil)-pirazina (b) presentes em uma amostra de *headspace* dinâmico de inflorescência de *Acrocomia aculeata*. A amplitude de resposta a (a) neste ensaio foi de 2,18 mV, e a (b) de 720  $\mu\text{V}$  Escala do EAD 10 mV, *Split* 1:10.

Nos ensaios eletroantenográficos com a mistura I, foi observada resposta das antenas de machos e fêmeas de *C. forsteri* a metil-2-metil-butarato (200 a 420  $\mu\text{V}$ ), 4-metil-5-viniltiazol (60 a 420  $\mu\text{V}$ ), a 2-isopropil-3-metoxipirazina (500  $\mu\text{V}$  a 1,82 mV), 4-metoxiestireno (180 a 540  $\mu\text{V}$ ) e a 2-metoxi-3-(1-metoxipirazina) (320 a 1,5 mV) (Figura 6.5). Já os testes com a mistura II evidenciaram resposta eletrofisiológica das antenas de *C. forsteri* ao anisol, com intensidades de resposta variando de 100 a 160  $\mu\text{V}$ , e ao 4-metil-anisol, com amplitude de resposta de 220 a 620  $\mu\text{V}$  (Figura 6.6).



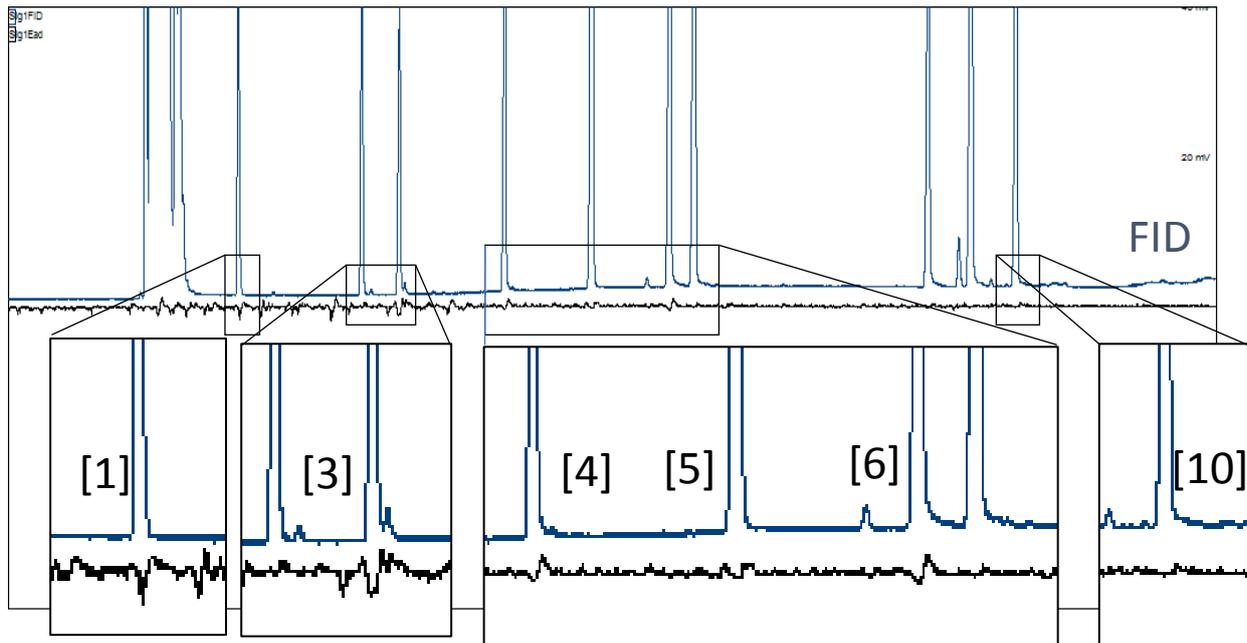
**Figura 6.5:** Resposta eletrofisiológica de antena de *Cyclocephala forsteri* fêmea a metil-2-metil-butirato [1], 4-metil-5-viniltiazol [4], 2-isopropil-3-metoxipirazina [5], 4-metoxiestireno [6] e 2-metoxi-3-(1-metoxipirazina) [7]. A amplitude de resposta aos compostos neste ensaio foi de: [1] 440  $\mu\text{V}$ , [4] 420  $\mu\text{V}$ , [5] 640  $\mu\text{V}$  [6] 460  $\mu\text{V}$  e [7] 420  $\mu\text{V}$ . Escala do EAD 10 mV, *Split* 1:100. (Os números em colchetes referem-se à numeração na tabela 6.1).



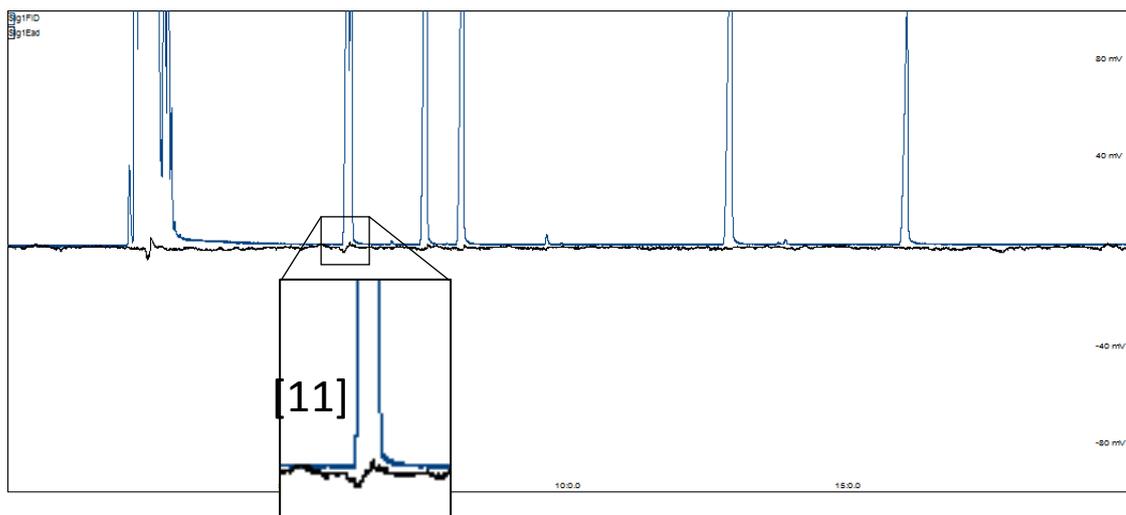
**Figura 6.6:** Resposta eletrofisiológica de antena de *C. forsteri* macho a anisol [11] e a 4-metil-anisol [14]. A amplitude de resposta a [11] neste ensaio foi de 120  $\mu\text{V}$  e para [14] foi de 380  $\mu\text{V}$ . Escala do EAD 10 mV, *Split* 1:50. (Os números entre colchetes referem-se à numeração na tabela 6.1).

### 6.3.2.3 *Cyclocephala cearae*

Foram realizados ensaios eletroantegráficos com machos e fêmeas de *C. cearae* para os compostos sintéticos presentes nas misturas I e II. Nos testes realizados com a mistura I, foi observada resposta das antenas a metil-2-metil-butirato (60 a 180  $\mu\text{V}$ ), (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona (120 a 220  $\mu\text{V}$ ), 4-metil-5-viniltiazol (60 a 120  $\mu\text{V}$ ), a 2-isopropil-3-metoxipirazina (60  $\mu\text{V}$  a 120  $\mu\text{V}$ ) e 4-metoxiestireno (100 a 200  $\mu\text{V}$ ) e diidro- $\beta$ -ionona (60  $\mu\text{V}$  a 100  $\mu\text{V}$ ) (Figura 6.7). Nos ensaios eletroantegráficos com a mistura II para esta espécie, foi observada resposta ao composto anisol, com amplitude de resposta variando de 60 a 100  $\mu\text{V}$  (Figura 6.8).



**Figura 6.7:** Resposta eletrofisiológica de antena de *Cyclocephala cearae* fêmea a metil-2-metil-butirato [1], (*S*)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona [3], 4-metil-5-viniltiazol [4], 2-isopropil-3-metoxipirazina [5] e 4-metoxiestireno [6]. Nesta análise não foi observada resposta à diidro- $\beta$ -ionona [10]. A amplitude de resposta aos compostos neste ensaio foi de: [1] 180  $\mu$ V, [3] 200  $\mu$ V, [4] 60  $\mu$ V [5] 80  $\mu$ V e [6] 120  $\mu$ V. Escala do EAD 10 mV, *Split* 1:50. (Os números entre colchetes referem-se à numeração na tabela 6.1).



**Figura 6.8:** Resposta eletrofisiológica de antena de *C. cearae* fêmea a anisol [11]. A amplitude de resposta a [11] neste ensaio foi de 60  $\mu$ V. Escala do EAD 10 mV, *Split* 1:20. (O número entre colchetes refere-se à numeração na tabela 6.1).

## 6.4 DISCUSSÃO

### 6.4.1 Composição dos odores florais

A composição do odor floral de *P. mello-barretoanum* difere bastante das outras duas espécies de Araceae estudadas neste trabalho (*P. acutatum* e *Taccarum ulei*), sendo dominado por (Z)-jasmona, um composto amplamente conhecido como componente em voláteis de plantas (Birkett et al., 2000; Knudsen et al., 2006) e (Z)-pent-2-en-1-il-acetato. Essa composição é semelhante à observada por Gottsberger e colaboradores (2013) em *P. bipinnatifidum*, que apresenta na fase feminina um aroma composto por (Z)-2-Pentenil acetato (com proporção variável entre 16,8 a 94,1%) e (Z)-jasmona (que pode representar 3,8 a 75,8 % da composição). Em *P. selloum*, outra espécie estudada por esses autores, as inflorescências pistiladas liberam um aroma constituído primariamente por dois compostos aromáticos: 4-metoxiestireno (66,5 %) e 3,4-metoxiestireno (21,6 %), com (Z)-jasmona em menor proporção (8,7 %). A arácea *Montrichardia arborescens*, polinizada por *C. colasi*, também apresenta (Z)-jasmona como um de seus constituintes majoritários (Gibernau et al., 2003).

Na amostra de odor floral de *A. aculeata* estudada, foram encontrados 4-metil-anisol e 2-metoxi-3-(1-metilpropil)-pirazina. Esses dois compostos são comumente encontrados em espécies de Areceaceae. O composto metoxilado 4-metil-anisol é o principal componente do odor floral de *Phytelephas aequatorialis*, *P. macrocarpa* e *P. seemanii*, constituindo mais de 99% da composição relativa; enquanto que 2-metoxi-3-(1-metilpropil)-pirazina é o componente majoritário do odor floral em *Aphandra natalia* representando de 79% a 94% da composição do odor floral (Ervik et al., 1999).

### 6.4.2 Testes eletrofisiológicos

Entre as espécies de Cyclocephalini estudadas neste trabalho, as antenas de *E. emarginata* renderam os melhores resultados, com maior estabilidade e respostas nítidas. Por ser uma espécie maior que as espécies de *Cyclocephala* estudadas, *E. emarginata* apresenta antenas maiores e mais robustas, que resistem melhor à manipulação durante a montagem da antena no sistema de GC-EAD.

As antenas de *E. emarginata* e das duas espécies de *Cyclocephala* responderam aos compostos metoxilados anisol, 2-isopropil-3-metoxi-pirazina e 4-metoxi-estireno; respostas para 2-metoxi-3-(1-metoxi-pirazina) foram observadas para as antenas de *E. emarginata* e *C. forsteri*. Respostas ao composto heterocíclico contendo enxofre e nitrogênio, o 4-metil-5-

viniltiazol, também foram observadas nas três espécies estudadas. Esta é a primeira vez que evidência eletrofisiológica de resposta das antenas de besouros Cyclocephalini a compostos incomuns encontrados em plantas cantarófilas é apresentada.

O benzenóide metoxilado anisol já foi descrito como feromônio de agregação em *Holotrichia consanguinia* (Melolonthidae; Melolonthinae), sendo produzido e liberado por glândulas abdominais em fêmeas desta espécie (Leal et al., 1996). O composto metoxilado metil-2-metil-butirato, que foi eletrofisiologicamente ativo para *C. forsteri* e *C. cearae*, é liberado por flores de *Magnolia ovata* (Magnoliaceae) durante a termogênese floral, na fase pistilada e estaminada da antese. Os besouros da espécie *C. literata*, único polinizador de *M. ovata*, foram atraídos por metil-2-metil-butirato em teste de campo (Gottsberger et al., 2012). Maia et al. (2012) mostraram que o composto 4-metil-5-viniltiazol, que induziu respostas nas antenas de *C. forsteri*, *C. cearae* e *E. emarginata*, foi ativo na captura em campo de outras três espécies de *Cyclocephala*: *C. celata*, *C. vestita* e *C. atricapilla*.

Nos ensaios eletroantegráficos realizados com *E. emarginata* foram observadas respostas ao segundo composto majoritário presente no odor floral de *P. mello-barretoanum* (*Z*)-Pent-2-en-1-il-acetato e ao seu isômero (*Z*)-pent-1-en-3-il-acetato. Dötterl et al (2012) observou em campo atratividade de *E. emarginata* para o benzenóide metoxilado 4-metoxiestireno e para misturas binárias de 4-metoxiestireno/ 3,4-dimetoxi-estireno e 4-metoxiestireno/(*Z*)-jasmona. Nos testes eletrofisiológicos realizados com a mistura de compostos neste trabalho (mistura I), não foi observada respostas eletroantegráficas nítidas para o benzenóide 3,4-dimetoxiestireno, nem para (*Z*)-jasmona nas concentrações testadas; apenas o composto 4-metoxiestireno se mostrou eletrofisiologicamente ativo nos ensaios de GC-EAD, indicando que este é o composto responsável pela atratividade em campo de *E. emarginata*.

Nos testes realizados neste trabalho, não foi observada resposta das antenas de *E. emarginata* para diidro- $\beta$ -ionona, composto cuja atratividade em campo foi observada em uma população de *E. emarginata* em Minas Gerais (Pereira et al, 2014). A ausência de respostas das antenas deste besouro à diidro- $\beta$ -ionona durante os testes de GC-EAD pode estar relacionada à concentração desta molécula na mistura I. Em geral, a sensibilidade das sensilas olfativas nas antenas aumenta proporcionalmente à concentração dos compostos, porém, após certo limite de concentração, a antena entra em processo de saturação e a resposta não mais aumenta proporcionalmente à dose (Henzell, 1974), fato que foi observado nas antenas dos besouros *C. celata* e *C. cearae*, que não mostraram resposta aos compostos presentes no *headspace* de odor floral nos ensaios realizados com amostra em alta concentração (Capítulos 3 e 4). Outra possível

explicação é a especialização regional de populações. Tanto a arácea *P. mello-barretoanum* quanto o besouro *E. emarginata* apresentam uma ampla distribuição geográfica e ambos já foram registrados em outras associações planta-polinizador.

Os demais compostos presentes na mistura, que foram identificados em espécies de Araceae polinizadas por *Cyclocephala* ou *Erioscelis* (metil-2-metil-butirato, 2-hidroxy-5-metil-3-hexanona e 1,3,5-trimetoxibenzeno), foram eletrofisiologicamente inativos para a população de *E. emarginata* estudada neste trabalho. Foi observada resposta eletrofisiológica das antenas dos besouros *E. emarginata* às duas pirazinas testadas, embora estes compostos não tenham sido descritos em plantas polinizadas por esta espécie de besouro.

Nos testes de eletrofisiologia realizados com as antenas de *C. forsteri* foi observada resposta aos dois compostos presentes no odor floral de *A. aculeata*: 4-metil-anisol e 2-metoxi-3-(1-metilpropil)-pirazina. Os dois componentes do odor floral de *A. aculeata*, ocorrem também em outras espécies de Arecaceae visitadas por besouros Cyclocephalini (Ervik et al., 1999).

## 6.5 CONCLUSÕES

Os ensaios eletrofisiológicos realizados com as três espécies de besouros Cyclocephalini *E. emarginata*, *C. forsteri* e *C. cearae* mostraram que as antenas de machos e fêmeas destas espécies respondem aos compostos metoxilados anisol, 2-isopropil-3-metoxi-pirazina, 4-metoxi-estireno e ao composto heterocíclico contendo enxofre e nitrogênio 4-metil-5-viniltiazol. Respostas ao composto metil-2-metil-butirato foram observadas para ambas as espécies de *Cyclocephala*, enquanto que as antenas de *E. emarginata* e *C. forsteri* responderam a 2-metoxi-3-(1-metoxi-pirazina). Foram ainda observadas respostas exclusivas dos besouros a compostos presentes em suas respectivas plantas hospedeiras: *E. emarginata* a (Z)-Pent-2-en-1-il-acetato e (Z)-pent-1-en-3-il-acetato, *C. forsteri* a 4-metil-anisol e *C. cearae* a (S)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona. Estudos eletrofisiológicos com outras espécies de Cyclocephalini podem ajudar a compreender melhor as diferentes preferências dos besouros em nível antenal e funcional.

## 7 CONCLUSÕES

Ao longo deste trabalho foram estudados diferentes aspectos da ecologia química de espécies de besouros da tribo Cyclocephalini (Melolonthidae; Dynastinae), relacionados à sua biologia reprodutiva. A extração e análise dos hidrocarbonetos cuticulares dos besouros mostraram que há uma clara diferença na composição das três espécies estudadas, com predominância de dois alcenos monoinsaturados com 25 átomos de carbono e dos alcanos n-tricosano (C 23) e n-pentacosano (C 25) em *Cyclocephala cearae*; de um alceno monoinsaturado com 23 átomos de carbono em *C. celata* e de n-heptacosano (C 27) seguido de um alceno monoinsaturado com 31 átomos de carbono e do alcano n-pentacosano em *Erioscelis emarginata*.

O desenvolvimento neste trabalho de uma nova técnica para a montagem das antenas lameladas de Melolonthidae permitiu que fosse demonstrada pela primeira vez na literatura a resposta eletrofisiológica de besouros antófilos da tribo Cyclocephalini a compostos voláteis exalados pelas inflorescências de suas plantas hospedeiras.

As respostas eletrofisiológicas e comportamentais de *Cyclocephala celata* e *C. cearae* aos odores florais de *Philodendrum acutatum* e *Taccarum ulei*, respectivamente, mostraram que os besouros reconhecem os semioquímicos das inflorescências destas aráceas e que estes sinais olfativos são suficientes para desencadear a resposta comportamental independentemente de outros sinais florais. Os resultados obtidos podem ajudar a compreender melhor as diferentes preferências dos besouros em nível antenal e funcional.

## REFERÊNCIAS

- Adams, R.P. (2007). Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry (Carol Stream, IL: Allured Publishing Co.).
- AGRITEMPO (2014). EMBRAPA – Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura – Sistema de Monitoramento Agrometeorológico. Disponível em: <http://www.agritempo.gov.br/agritempo/index.jsp>.
- Altafini, D.L. (2008). Percepção química de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) ao feromônio sexual e a voláteis de plantas hospedeiras. Dissertação. PUCRS.
- Angioy, A.-M., Stensmyr, M.C., Urru, I., Puliafito, M., Collu, I., Hansson, B.S. (2004). Function of the heater: the dead horse arum revisited. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 271, S13–S15.
- Azuma, H., Toyota, M., Asakawa, Y., Yamaoka, R., Garcia-Franco, J.G., Dieringer, G., Thien, L.B., Kawano, S. (1997). Chemical divergence in floral scents of *Magnolia* and allied genera (Magnoliaceae). *Plant Species Biol.* 12, 69–83.
- Beach, J.H. (1982). Beetle Pollination of *Cyclanthus bipartitus* (Cyclanthaceae). *Am. J. Bot.* 69, 1074–1081.
- Beath, D.N. (1999). Dynastine scarab beetle pollination in *Dieffenbachia longispatha* (Araceae) on Barro Colorado island (Panama) compared with La Selva Biological Station (Costa Rica). *Aroideana* 22, 61–71.
- Bergström, L.G.W. (2008). Chemical communication by behaviour-guiding olfactory signals. *Chem. Commun.* 3959.
- Bernhardt, P. (2000). Convergent evolution and adaptive radiation of beetle-pollinated angiosperms. *Plant Syst. Evol.* 222, 293–320.
- Birkett, M.A., Campbell, C.A., Chamberlain, K., Guerrieri, E., Hick, A.J., Martin, J.L., Matthes, M., Napier, J.A., Pettersson, J., Pickett, J.A., et al. (2000). New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9329–9334.
- Blomquist, G.J., Bagnères, A.-G. (2010). *Insect Hydrocarbons Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology* (New York: Cambridge University Press).
- Bouchard, P., Bousquet, Y., Davies, A., Alonso-Zarazaga, M., Lawrence, J., Lyal, C., Newton, A., Reid, C., Schmitt, M., Slipinski, A., et al. (2011). Family-Group Names In Coleoptera (Insecta). *ZooKeys* 88.
- Broderbauer, D., Diaz, A., Weber, A. (2012). Reconstructing the origin and elaboration of insect-trapping inflorescences in the Araceae. *Am. J. Bot.* 99, 1666–1679.
- Buss, E.A. (2006). Flight activity and relative abundance of phytophagous scarabs (Coleoptera: Scarabaeoidea) from two locations in Florida. *Fla. Entomol.* 89, 32–40.
- CATE Araceae (2014). eMonocot Team *Philodendron mello-barretoanum* CATE Araceae <http://araceae.e-monocot.org/taxonomy/term/2050> (accessed 7 October 2014).

- Cherman, M.A., Morón, M.A. (2014). Validación de la familia Melolonthidae Leach, 1819 (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Acta Zool. Mex.* 30, 201–220.
- Choe, D.-H., Ramírez, S.R., Tsutsui, N.D. (2012). A Silica Gel Based Method for Extracting Insect Surface Hydrocarbons. *J. Chem. Ecol.* 38, 176–187.
- Clark, D.R. (2011). Phylogenetic analysis of the scarab beetle tribe Cyclocephalini (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae) based on adult morphological characters. Thesis. Brigham Young University.
- Dahbi, A., Cerdá, X., Hefetz, A., Lenoir, A. (1996). Social closure, aggressive behavior, and cuticular hydrocarbon profiles in the polydomous ant *Cataglyphis iberica* (hymenoptera, Formicidae). *J. Chem. Ecol.* 22, 2173–2186.
- Dieringer, G., Cabrera R., L., Lara, M., Loya, L., Reyes-Castillo, P. (1999). Beetle Pollination and Floral Thermogenicity in *Magnolia Tamaulipana* (Magnoliaceae). *Int. J. Plant Sci.* 160, 64–71.
- Diez-Rodríguez, G.I., Hübner, L.K., Antunes, L.E.C., Guedes, J.V.C., Nava, D.E. (2015). Registro de *Cyclocephala flavipennis* Arrow, 1914 (Coleoptera: Melolonthidae) danificando plantas de mirtilheiro no Brasil. *Ciênc. Rural* 45, 189–191.
- Dobson, H.E.M. (2006). Relationship between floral fragrance composition and type of pollinator. In *Biology of Floral Scen*, N. Dudareva, E. Pichersky, eds. (Boca Raton: CRC Press), pp. 147–198.
- Donaldson, J.M.I., McGovern, T.P., Ladd Jr., T. (1986). Trapping Techniques and Attractants for Cetoniinae and Rutelinae (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Econ. Entomol.* 79, 374–377.
- Donaldson, J.M.I., McGovern, T.P., Ladd Jr., T. (1990). Floral Attractants for Cetoniinae and Rutelinae (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Econ. Entomol.* 83, 1298–1305.
- Dötterl, S., David, A., Boland, W., Silberbauer-Gottsberger, I., Gottsberger, G. (2012). Evidence for Behavioral Attractiveness of Methoxylated Aromatics in a Dynastid Scarab Beetle-Pollinated Araceae. *J. Chem. Ecol.* 38, 1539–1543.
- Drijfhout, F.P. (2009). Cuticular Hydrocarbons: A New Tool in Forensic Entomology? In *Current Concepts in Forensic Entomology*, J. Amendt, M.L. Goff, C.P. Campobasso, M. Grassberger, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 179–203.
- EMBRAPA (2008). Eletroantenografia - a antena do inseto como um biossensor.
- Endrödi, S. (1966). Monographie der Dynastinae (Coleoptera, Lamellicornia) (Staatliches Museum für Tierkunde).
- Ervik, F., Knudsen, J.T. (2003). Water lilies and scarabs: faithful partners for 100 million years? *Biol. J. Linn. Soc.* 80, 539–543.
- Ervik, F., Tollsten, L., Knudsen, J.T. (1999). Floral scent chemistry and pollination ecology in phytelephantoid palms (Arecaceae). *Plant Syst. Evol.* 217, 279–297.
- Endrödi, S. (1985). *The Dynastinae of the World* (Dordrecht: W. Junk Publishers).

- Ferreira-Caliman, M.J., Andrade-Silva, A.C.R., Guidetti-Campos, M.C., Casanova Turatti, I.C., Santos do Nascimento, F., Lopes, N.P. (2014). A non-lethal SPME method for insect cuticular analysis by GC-MS. *Anal Methods* 8, 8823-8828.
- Fombong, A.T., Teal, P.E.A., Arbogast, R.T., Ndegwa, P.N., Irungu, L.W., Torto, B. (2012). Chemical Communication in the Honey Bee Scarab Pest *Oplostomus haroldi*: Role of (Z)-9-Pentacosene. *J. Chem. Ecol.* 38, 1463–1473.
- Gibernau, M., Barabé, D. (2000). Thermogenesis in three *Philodendron* species (Araceae) of French Guiana. *Can. J. Bot.* 78, 685–689.
- Gibernau, M., Barabé, D. (2002). Pollination ecology of *Philodendron squamiferum* (Araceae). *Can. J. Bot.* 80, 316–320.
- Gibernau, M., Barabé, D., Cerdan, P., Dejean, A. (1999). Beetle pollination of *Philodendron solimoesense* (Araceae) in French Guiana. *Int. J. Plant Sci.* 160, 1135–1143.
- Gibernau, M., Barabé, D., Labat, D. (2000). Flowering and Pollination of *Philodendron melinonii* (Araceae) in French Guiana. *Plant Biol.* 2, 331–334.
- Gibernau, M., Barabé, D., Labat, D., Cerdan, P., Dejean, A. (2003). Reproductive biology of *Montrichardia arborescens* (Araceae) in French Guiana. *J. Trop. Ecol.* 19.
- Gillot, C. (2005). *Entomology* (Dordrecht: Springer).
- Ginzel, M.D., Moreira, J.A., Ray, A.M., Millar, J.G., Hanks, L.M. (2006). (Z)-9-nonacosene-major component of the contact sex pheromone of the beetle *Megacyllene caryae*. *J. Chem. Ecol.* 32, 435–451.
- Gomes, C.C.G. (2011). O Papel dos Feromônios na Comunicação Química de Moscas de Interesse na Saúde Animal (Bagé: Embrapa Pecuária Sul).
- Gottsberger, G. (1986). Some Pollination Strategies in Neotropical Savannas and Forests. *Plant Syst. Evol.* 152, 29–45.
- Gottsberger, G. (1989). Beetle pollination and flowering rhythm of *Annona* spp. (Annonaceae) in Brazil. *Plant Syst. Evol.* 167, 165–187.
- Gottsberger, G. (1990). Flowers and Beetles in the South American Tropics. *Bot. Acta* 103, 360–365.
- Gottsberger, G., Amaral Jr., A. (1984). Pollination Strategies in Brazilian *Philodendron* Species. *Berichte Dtsch. Bot. Ges.* 97, 391–410.
- Gottsberger, G., Silberbauer-Gottsberger, Ilse (1991). Olfactory and Visual Attraction of *Erioscelis emarginata* (Cyclocephalini, Dynastinae) to the Inflorescences of *Philodendron selloum* (Araceae). *Biotropica* 23, 23–28.
- Gottsberger, G. (1999). Pollination and evolution in neotropical Annonaceae. *Plant Species Biol.* 14, 143–152.
- Gottsberger, G., Silberbauer-Gottsberger, I., Seymour, R.S., Dötterl, S. (2012). Pollination ecology of *Magnolia ovata* may explain the overall large flower size of the genus. *Flora* 207, 107–118.

- Gottsberger, G., Silberbauer-Gottsberger, I., Dötterl, S. (2013). Pollination and floral scent differentiation in species of the *Philodendron bipinnatifidum* complex (Araceae). *Plant Syst. Evol.* 299, 793–809.
- Greene, M.J., Gordon, D.M. (2003). Social insects: Cuticular hydrocarbons inform task decisions. *Nature* 423, 32–32.
- Grossi, P.C., Santos, M.D., Almeida, L.M. (2016). Two new species of *Cyclocephala* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) from Minas Gerais State, Brazil. *Zootaxa* 4078, 245.
- Guillem, R.M., Drijfhout, F.P., Martin, S.J. (2012). Using chemo-taxonomy of host ants to help conserve the large blue butterfly. *Biol. Conserv.* 148, 39–43.
- Gullan, P.J., Cranston, P.S. (2008). *Os Insetos-Um resumo de entomologia* (São Paulo: Roca).
- Hadley, N.F. (1980). Surface Waxes and Integumentary Permeability: Lipids deposited on or associated with the surface of terrestrial plants and animals help protect them from a lethal rate of desiccation. *Am. Sci.* 68, 546–553.
- Henzell, R.F. (1974). Electroantennogram responses of male *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) to phenol and related compounds. *N. Z. J. Zool.* 1, 515–522.
- Hirai, Y., Akino, T., Wakamura, S., Arakaki, N. (2008). Morphological and chemical comparison of males of the white grub beetle *Dasylepida ishigakiensis* (Coleoptera: Scarabaeidae) among four island populations in the Sakishima Islands of Okinawa. *Appl. Entomol. Zool.* 43, 65–72.
- Howard, R.W. (1992). Comparative Analysis of Cuticular Hydrocarbons from the Ectoparasitoids *Cephalonomia waterstoni* and *Laelius utilis* (Hymenoptera: Bethyridae) and Their Respective Hosts, *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: Cucujidae) and *Trogoderma variabile* (Coleoptera: Dermestidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 85, 317–325.
- Howard, R.W., Blomquist, G.J. (1982). Chemical Ecology and Biochemistry of Insect Hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.* 27, 149–172.
- Howard, R.W., Blomquist, G.J. (2005). Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 371–393.
- Jackson, L.L., Bartelt, R.J. (1986). Cuticular hydrocarbons of *Drosophila virilis*. *Insect Biochem.* 16, 433–439.
- Jameson, M.L., Ratcliff, B.C., Maly, V. (2002). Review of the genus *Acrobolbia* with remarks on its classification, and a key to the world genera of Cyclocephalini (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae). *FOLIA HEYROVSKYANA* 10, 1–15.
- Johnson, S.D., Griffiths, M.E., Peter, C.I., Lawes, M.J. (2009). Pollinators, “mustard oil” volatiles, and fruit production in flowers of the dioecious tree *Drypetes natalensis* (Putranjivaceae). *Am. J. Bot.* 96, 2080–2086.
- Jutsum, A.R., Saunders, T.S., Cherrett, J.M. (1979). Intraspecific aggression is the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Anim. Behav.* 27, 839–844.

- Kather, R., Martin, S.J. (2012). Cuticular hydrocarbon profiles as a taxonomic tool: advantages, limitations and technical aspects. *Physiol. Entomol.* 37, 25–32.
- Kather, R., Martin, S.J. (2015). Evolution of Cuticular Hydrocarbons in the Hymenoptera: a Meta-Analysis. *J. Chem. Ecol.* 41, 871–883.
- Khbaish, H. (2010). Identification of olfactory receptor neurons in two Species of scarab beetles: a comparative study by means of single sensillum recording. Master thesis. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Klink, C.A., Machado, R.B. (2005). Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conserv. Biol.* 19, 707–713.
- Knudsen, J.T., Eriksson, R., Gershenzon, J., Ståhl, B. (2006). Diversity and Distribution of Floral Scent. *Bot. Rev.* 72, 1–120.
- Ladd, T.L., McGovern, T.P. (1980). Japanese Beetle: A Superior Attractant, Phenethyl Propionate + Eugenol + Geraniol, 3:7:3. *J. Econ. Entomol.* 73, 689–691.
- Larsson, M.C., Stensmyr, M.C., Bice, S.B., Hansson, B.S. (2003). Attractiveness of fruit and flower odorants detected by olfactory receptor neurons in the fruit chafer *Pachnoda marginata*. *J. Chem. Ecol.* 29, 1253–1268.
- Leal, W.S. (1998). Chemical ecology of phytophagous scarab beetles. *Annu. Rev. Entomol.* 43, 39–61.
- Leal, W.S., Mochizuki, F., Wakamura, S., Yasuda, T. (1992). Electroantennographic Detection of *Anomala cuprea* Hope (Coleoptera: Scarabaeidae) Sex Pheromone. *Appl. Entomol. Zool.* 27, 289–291.
- Leal, W.S., Yadava, C.P.S., Vijayvergia, J.N. (1996). Aggregation of the scarab beetle *Holotrichia consanguinea* in response to female-released pheromone suggests secondary function hypothesis for semiochemical. *J. Chem. Ecol.* 22, 1557–1566.
- Leal, W.S., Zarbin, P.H., Wojtasek, H., Kuwahara, S., Hasegawa, M., Ueda, Y. (1997). Medicinal alkaloid as a sex pheromone. *Nature* 385, 213.
- Liang, D., Silverman, J. (2000). “You are what you eat”: diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. *Naturwissenschaften* 87, 412–416.
- Lockey, K.H. (1988). Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 89, 595–645.
- Lockey, K.H. (1991). Insect hydrocarbon classes: Implications for chemotaxonomy. *Insect Biochem.* 21, 91–97.
- Loughrin, J.H., Potter, D.A., Hamilton-Kemp, T.R. (1995). Volatile compounds induced by herbivory act as aggregation kairomones for the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newman). *J. Chem. Ecol.* 21, 1457–1467.
- Maia, A.C.D., Schlindwein, C. (2006). *Caladium bicolor* (Araceae) and *Cyclocephala celata* (Coleoptera, Dynastinae): A Well-Established Pollination System in the Northern Atlantic Rainforest of Pernambuco, Brazil. *Plant Biol.* 8, 529–534.

- Maia, A.C.D., Schlindwein, C., Navarro, D.M.A.F., Gibernau, M. (2010). Pollination of *Philodendron acutatum* (Araceae) in the Atlantic Forest of Northeastern Brazil: A Single Scarab Beetle Species Guarantees High Fruit Set. *Int. J. Plant Sci.* 171, 740–748.
- Maia, A.C.D. (2011) Atração olfatória em sistemas de polinização Cyclocephalini-arácea (Scarabaeidae; Dynastinae; Araceae) e manutenção em cativeiro de *Cyclocephala*. Tese de doutorado. João Pessoa, 111p.
- Maia, A.C.D., Dötterl, S., Kaiser, R., Silberbauer-Gottsberger, I., Teichert, H., Gibernau, M., Amaral Ferraz Navarro, D.M., Schlindwein, C., Gottsberger, G. (2012). The Key Role of 4-methyl-5-vinylthiazole in the Attraction of Scarab Beetle Pollinators: a Unique Olfactory Floral Signal Shared by Annonaceae and Araceae. *J. Chem. Ecol.* 38, 1072-1080.
- Maia, A.C.D., Gibernau, M., Dötterl, S., Navarro, D.M. do A.F., Seifert, K., Müller, T., Schlindwein, C. (2013a). The floral scent of *Taccarum ulei* (Araceae): Attraction of scarab beetle pollinators to an unusual aliphatic acyloin. *Phytochemistry* 93, 71–78.
- Maia, A.C.D., Gibernau, M., Carvalho, A.T., Gonçalves, E.G., Schlindwein, C. (2013b). The cowl does not make the monk: scarab beetle pollination of the neotropical aroid *Taccarum ulei* (Araceae: Spathicarpeae): Pollination of *Taccarum ulei*. *Biol. J. Linn. Soc.* 108, 22–34.
- Marques, F. de A., Wendler, E.P., Macedo, A., Wosch, C.L., Maia, B.H.S., Mikami, A.Y., Arruda-Gatti, I.C., Pissinati, A., Mingotte, F.L.C., Alves, A., et al. (2009). Response of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) to 1,4-dimethoxybenzene and analogs in common bean crop. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52, 1333–1340.
- Martin, S., Drijfhout, F. (2009). A Review of Ant Cuticular Hydrocarbons. *J. Chem. Ecol.* 35, 1151–1161.
- Martin, S.J., Zhong, W., Drijfhout, F.P. (2009). Long-term stability of hornet cuticular hydrocarbons facilitates chemotaxonomy using museum specimens: CUTICULAR HYDROCARBONS. *Biol. J. Linn. Soc.* 96, 732–737.
- Matthews, R.W., Matthews, J.L. (2010). *Insect behavior* (Dordrecht: Springer).
- Morel, L., Vander Meer, R.K., Lavine, B.K. (1988). Ontogeny of nestmate recognition cues in the red carpenter ant (*Camponotus floridanus*): Behavioral and chemical evidence for the role of age and social experience. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 22, 175–183.
- Mayo, S.J., Bogner, J., Boyce, P.C. (1997). *The genera of Araceae* (Belgium: Continental Printing).
- Milet-Pinheiro, P., Schlindwein, C. (2005). Do euglossine males (Apidae, Euglossini) leave tropical rainforest to collect fragrances in sugarcane monocultures? *Rev. Bras. Zool.* 22, 853–858.
- Moore, M.R. (2012). A New Female Elytral Character for the Tribe Cyclocephalini (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae) and an Observation of its Possible Function. *Coleopt. Bull.* 66, 200–202.
- Moore, M.R., Jameson, M.L. (2013). Floral associations of cyclocephaline scarab beetles. *J. Insect Sci. Online* 13, 100.

- Mora-Aguilar, E.F., Delgado, L. (2012). A New Species of *Cyclocephala* Dejean (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae: Cyclocephalini) from the Cloud Forests of Southeastern Mexico Description of the Female of *Cyclocephala berti* Delgado. *Coleopt. Bull.* 66, 139–142.
- NCBI Taxonomy, (2015). registry-migration.gbif.org
- NIST WebBookk (2014). National Institute of Standards and technology. <http://www.nist.gov/>.
- Oliveira, H.N. de, Ávila, C.J. (2011). Ocorrência de *Cyclocephala forsteri* em *Acronomia aculeata*. *Pesqui. Agropecuária Trop.* 41.
- Pellmyr, O., Thien, L.B. (1986). Insect Reproduction and Floral Fragrances: Keys to the Evolution of the Angiosperms? *Taxon* 35, 76–85.
- Pereira, J., Schlindwein, C., Antonini, Y., Maia, A.C.D., Dötterl, S., Martins, C., Navarro, D.M. do A.F., Oliveira, R. (2014). *Philodendron adamantinum* (Araceae) lures its single cyclocephaline scarab pollinator with specific dominant floral scent volatiles: Pollination of *Philodendron Adamantinum*. *Biol. J. Linn. Soc.* 111, 679–691.
- Peschke, K., Metzler, M. (1987). Cuticular hydrocarbons and female sex pheromones of the rove beetle, *Aleochara curtula* (Goeze) (Coleoptera:Staphylinidae). *Insect Biochem.* 17, 167–178.
- Peterson, M.A., Dobler, S., Larson, E.L., Juárez, D., Schlarbaum, T., Monsen, K.J., Francke, W. (2007). Profiles of cuticular hydrocarbons mediate male mate choice and sexual isolation between hybridising *Chrysochus* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Chemoecology* 17, 87–96.
- Potter, D.A., Held, D.W. (2002). Biology and management of the japanese beetle. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 175–205.
- Pureswaran, D.S., Poland, T.M. (2009). The Role of Olfactory Cues in Short-Range Mate Finding by the Emerald Ash Borer, *Agrilus planipennis* Fairmaire (Coleoptera: Buprestidae). *J. Insect Behav.* 22, 205–216.
- Raguso, R.A. (2008). PLANT SCIENCE: The “Invisible Hand” of Floral Chemistry. *Science* 321, 1163–1164.
- Ratcliffe, B.C. (2008). More New Species of *Cyclocephala* Dejean, 1821 from South America (Scarabaeidae: Dynastinae: Cyclocephalini). *Coleopt. Bull.* 62, 221–241.
- Ratcliffe, B.C., Cave, R.D. (2009). New Species of *Cyclocephala* Dejean, 1821 from Guatemala (Scarabaeidae: Dynastinae: Cyclocephalini). *Coleopt. Bull.* 63, 325–332.
- Ratcliffe, B.C., Hoffman, R.L. (2011). *Cyclocephala nigricollis* Burmeister (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae: Cyclocephalini). What is It? and Where is It? *Coleopt. Bull.* 65, 135–138.
- Romero-Lopez, A.A. (2016). Comunicación química de coleópteros Melolonthidae distribuidos en México: a una década de distancia. *Dugesiana* 23, 59–73.
- Ruther, J., Reinecke, A., Thiemann, K., Tolasch, T., Francke, W., Hilker, M. (2000). Mate finding in the forest cockchafer, *Melolontha hippocastani*, mediated by volatiles from plants and females. *Physiol. Entomol.* 25, 172–179.

- Sabelis, M.W., Dicke, M. (1987). How Plants Obtain Predatory Mites as Bodyguards. *Neth. J. Zool.* 38, 148–165.
- Santos, V., Ávila, C.J., Portela, A.C.V., Ribeiro J.F. (2007). Ocorrência e aspectos biológicos de *Cyclocephala forsteri* Endrodi, 1963 (Coleoptera: Scarabaeidae) no Estado de Mato Grosso do Sul. In 10ª Reunião Sul-Brasileira Sobre Pragas de Solo. Pragas-Solo-Sul: Anais E Ata, (Embrapa Agropecuária Oeste), pp. 107–109.
- Saylor, L.W. (1946). Revision of the scarab beetles of the Dynastinae genus *Erioscelis*. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 48, 61–66.
- Schatz, G.E. (1990). Some aspects of pollination biology in Central American forests. In *Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants.*, K.S. Bawa, M. Hadley, eds. (Paris: Parthenon), pp. 69–84.
- Scott, M.P., Madjid, K., Orians, C.M. (2008). Breeding alters cuticular hydrocarbons and mediates partner recognition by burying beetles. *Anim. Behav.* 76, 507–513.
- Seymour, R.S. (1999). Pattern of respiration by intact inflorescences of the thermogenic arum lily *Philodendron selloum*. *J. Exp. Bot.* 50, 845–852.
- Seymour, R.S., Matthews, P.G.D. (2006). The Role of Thermogenesis in the Pollination Biology of the Amazon Waterlily *Victoria amazonica*. *Ann. Bot.* 98, 1129–1135
- Seymour, R.S., Schultze-Motel, P. (1997). Heat-producing flowers. *Endeavour* 21, 125–129.
- Seymour, R.S., White, C.R., Gibernau, M. (2009). Endothermy of dynastine scarab beetles (*Cyclocephala colasi*) associated with pollination biology of a thermogenic arum lily (*Philodendron solimoesense*). *J. Exp. Biol.* 212, 2960–2968.
- Silberbauer-Gottsberger, I. (1990). Pollination and evolution in palms. *Phyton* 30, 213–233.
- Silberbauer-Gottsberger, I., Gottsberger, G., Webber, A. (2003). Morphological and functional flower characteristics of New and Old World Annonaceae with respect to their mode of pollination. *Taxon* 52, 701–718.
- Smith, A.B.T. (2006). A review of the family-group names for the superfamily Scarabaeoidea (Coleoptera) with corrections to nomenclature and a current classification. *Coleopt. Soc. Monogr.* 5, 144–204.
- de Souza, T.B., Maia, A.C.D., Schlindwein, C., de Albuquerque, L.S.C., Iannuzzi, L. (2014). The life of *Cyclocephala celata* Dechambre, 1980 (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae) in captivity with descriptions of the immature stages. *J. Nat. Hist.* 48, 275–283.
- Singer, T.L. (1998). Roles of Hydrocarbons in the Recognition Systems of Insects. *Integr. Comp. Biol.* 38, 394–405.
- Stensmyr, M.C., Larsson, M.C., Bice, S.B., Hansson, B.S. (2001). Detection of fruit- and flower-emitted volatiles by olfactory receptor neurons in the polyphagous fruit chafer *Pachnoda marginata* (Coleoptera: Cetoniinae). *J. Comp. Physiol. A* 187, 509–519.
- Syntech (2004). *Electroantennography: a practical introduction*. Hilversum, The Netherlands.

- The Plant List (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/>.
- Thien, L.B., Bernhardt, P., Devall, M.S., Chen, Z. -d., Luo, Y. -b., Fan, J.-H., Yuan, L.-C., Williams, J.H. (2009). Pollination biology of basal angiosperms (ANITA grade). *Am. J. Bot.* *96*, 166–182.
- Thomas, B., Croat (1998). History and current status of systematic research with Araceae. *Aroideana* *21*, 26–145.
- Thomas, M.L., Simmons, L.W. (2008). Sexual dimorphism in cuticular hydrocarbons of the Australian field cricket *Teleogryllus oceanicus* (Orthoptera: Gryllidae). *J. Insect Physiol.* *54*, 1081–1089.
- Turillazzi, S., Sledge, M.F., Moneti, G. (1998). Use of a simple method for sampling cuticular hydrocarbons from live social wasps. *Ethol. Ecol. Evol.* *10*, 293–297.
- Valerio, C.E. (1984). Insect visitors to the inflorescence of the aroid *Dieffenbachia oerstedii* (Araceae) in Costa Rica. *Brenesia* *22*, 139–143.
- Vuts, J., Imrei, Z., Toth, M. (2010). New co-attractants synergizing attraction of *Cetonia aurata aurata* and *Potosia cuprea* to the known floral attractant. *J. Appl. Entomol.* *134*, 9–15.
- Vuts, J., Imrei, Z., Birkett, M.A., Pickett, J.A., Woodcock, C.M., Tóth, M. (2014). Semiochemistry of the Scarabaeoidea. *J. Chem. Ecol.* *40*, 190–210.
- van Wilgenburg, E., Sulc, R., Shea, K.J., Tsutsui, N.D. (2010). Deciphering the Chemical Basis of Nestmate Recognition. *J. Chem. Ecol.* *36*, 751–758.
- Williams, R.N., McGovern, T.P., Klein, M.G., Fickle, D.S. (1990). Rose Chafer (Coleoptera: Scarabaeidae): Improved Attractants for Adults. *J. Econ. Entomol.* *83*, 111–116.
- Wagner, D., Brown, M.J.F., Broun, P., Cuevas, W., Moses, L.E., Chao, D.L., Gordon, D.M. (1998). Task-Related Differences in the Cuticular Hydrocarbon Composition of Harvester Ants, *Pogonomyrmex barbatus*. *J. Chem. Ecol.* *24*, 2021–2137.
- Xue, H.-J., Zhang, B., Segraves, K.A., Wei, J.-N., Nie, R.-E., Song, K.-Q., Liu, J., Li, W.-Z., Yang, X.-K. (2016). Contact cuticular hydrocarbons act as a mating cue to discriminate intraspecific variation in *Altica* flea beetles. *Anim. Behav.* *111*, 217–224.
- Yarden, G., Shani, A., Leal, W.S. (1996). (Z, E)-alpha-farnesene--an electroantennogram-active component of *Maladera matrida* volatiles. *Bioorg. Med. Chem.* *4*, 283–287.
- Young, H.J. (1986). Beetle pollination of *Dieffenbachia longispatha* (Araceae). *Am. J. Bot.* *73*, 931–944.
- Zarbin, P.H., Ferreira, J.T.B., Leal, W.S. (1999). Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. *22*, 263–268.
- Zarbin, P.H.G., Rodrigues, M.A.C.M., and Lima, E.R. (2009). Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. *Quím. Nova* *32*, 722–731.

Zhang, B., Xue, H.-J., Song, K.-Q., Liu, J., Li, W.-Z., Nie, R.-E., Yang, X.-K. (2014). Male mate recognition via cuticular hydrocarbons facilitates sexual isolation between sympatric leaf beetle sister species. *J. Insect Physiol.* *70*, 15–21.