

**Estabelecimento da Composição
Volátil do Nutriente FNI 210 Usado pela
Ceratitis capitata (Wiedemann, 1824) e dos
Extratos de Diferentes Espécies de Plantas
Avaliação do potencial atrativo e repelente das plantas**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Maria de Fátima Rodrigues Sousa
MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

setembro | 2013

Ma

Est

T/M UMa

577

SOC EST

EX-1

72 266

**Estabelecimento da Composição
Volátil do Nutriente FNI 210 Usado pela
Ceratitis capitata (Wiedemann, 1824) e dos
Extratos de Diferentes Espécies de Plantas
Avaliação do potencial atrativo e repelente das plantas**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Maria de Fátima Rodrigues Sousa

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

UNIVERSIDADE DA MADEIRA
SECTOR DE DOCUMENTAÇÃO
E ARQUIVO

ORIENTADOR
Dora AguiM Pombo

CO-ORIENTADOR
Luís Miguel Fernandes Dantas

Projecto de Mestrado em Bioquímica Aplicada

Estabelecimento da composição volátil do nutriente FNI 210 usado pela *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) e dos extratos de diferentes espécies de plantas.
Avaliação do potencial atrativo e repelente das plantas.

Errata

Pág.	Linha	Onde se lê	Deve ler-se
48	19; 20	total de 1980 insetos, sendo utilizados por teste 660 machos virgens, 660 fêmeas virgens e 660 fêmeas não virgens.	total de 2160 insetos, sendo utilizados por teste 720 machos virgens, 720 fêmeas virgens e 720 fêmeas não virgens.
124	7	em grupos de 20	em grupos de 15
124	8	165 insetos	180 insetos
124	9	45 insetos	60 insetos
126	5	V. J. L. P. G. K. C. G. M. F. V. M. T. M. F. Lux S.A.,	Lux S.A., Vilarde J.C., Liedo P., Gaggl K., Calcagno G.E., Munyiri F.N., Vera M. T., Manso F.
126	13	K. M. A. M. B. E.	Passino G.S., Bazzoni E., Moretti M. D. L., Protá R.



Estabelecimento da composição volátil do nutriente FNI 210 usado pela *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) e dos extratos de diferentes espécies de plantas. Avaliação do potencial atrativo e repelente das plantas.

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DA MADEIRA para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Aplicada, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Dora Aguiar Pombo (Laboratório de Ecologia e Sistemática II do CCCV) e co-orientação Engenheiro Luís Dantas (Direção Regional de Agricultura e Desenvolvimento Rural)

Maria de Fátima Rodrigues Sousa

2012/2013

Funchal - Portugal

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial à minha orientadora Prof^a. Doutora Dora Aguium Pombo pela oportunidade, contributo científico, acompanhamento e principalmente pela compreensão. Ao meu co-orientador engenheiro Luís Dantas pela colaboração e disponibilidade.

Ao Centro de Química da Madeira (CQM) e à Universidade da Madeira que proporcionaram os meios necessários para a realização desta dissertação. Agradeço também ao Prof. Doutor José Câmara pelo apoio, interesse e cedência de material e equipamentos do seu laboratório para este estudo.

À Direção Regional de Agricultura e Desenvolvimento Rural (Biofábrica da Camacha) pelo fornecimento dos insetos, material e espaço para a realização deste projeto. E a todos os funcionários da Biofábrica da Camacha por toda a amizade e apoio. Agradeço também à Doutora Susana Fontinha e à Doutora Natália Silva pela transmissão de conhecimentos na realização deste projeto.

Ao Prof. Doutor Sílvio Velosa e Prof. Doutra Rita Vasconcelos pelo apoio prestado na realização de toda a análise estatística.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, principalmente ao João Gonçalves pela amizade, apoio e colaboração em todos os momentos. Aos técnicos de laboratório Paula Andrade, Paula Vieira e Adriano Faria pela atenção e disponibilidade.

Agradeço à minha família em especial aos meus pais e irmão por todo o vosso amor, apoio e acompanhamento em todos os momentos. E também ao meu namorado pelo seu carinho, incentivo e conselhos.

Agradeço aos meus colegas e amigos do curso e mestrado entre eles Cláudia Camacho e Ana Jardim. E a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a evolução deste trabalho.

RESUMO

A mosca da fruta é uma das principais pragas agrícolas. Neste trabalho determinou-se a composição volátil do nutriente FNI 210 (proteína alimentar) e dos extratos de cinco plantas: *Cedronella canariensis*, *Eucalyptus globulus*, *Laurus novocanariensis*, *Myrtus communis* e *Ruta chalepensis* e avaliou-se o seu potencial atrativo e repelente em moscas adultas num olfatómetro em Y. A composição volátil do nutriente e dos extratos foi semelhante à encontrada por outros autores e apresentou compostos atrativos para a mosca da fruta.

Nos bioensaios com o olfatómetro as moscas foram atraídas à proteína mas a percentagem média de respostas variou de acordo com o sexo, estado sexual, idade e número de indivíduos por grupo sendo mais alta aos 8 dias em grupos de 5. No geral, as fêmeas virgens responderam mais do que as não virgens e mais do que os machos virgens. O número de insetos que se dirigiram à proteína foi superior na primeira repetição nos primeiros 10 e 20 minutos. Contudo, em todos os bioensaios houve um número elevado de indivíduos não responderam.

Nos bioensaios das plantas a resposta do mesmo grupo de 5 indivíduos com 8 dias foi testada três vezes no olfatómetro pela ordem seguinte: sem amostra, com proteína e com extrato de planta. Nos três casos as respostas dos adultos variaram de acordo com o sexo e estado sexual. As percentagens médias de respostas aos extratos foram superiores às obtidas nos ensaios sem amostra e menores que à proteína, à exceção do extrato de *L. novocanariensis* que apresentou um potencial atrativo superior ao da proteína nos machos virgens. Nos testes com o extrato, as respostas ao braço com amostra foram superiores ao braço sem amostra, à exceção das respostas das fêmeas não virgens ao extrato de *R. chalepensis*, o que sugere ser esta a única planta com potencial repelente.

Palavras-Chave: Mosca da fruta, Atrativos, Repelentes, Extratos de plantas, Compostos voláteis, Olfatómetro

Analyses of the volatile composition of the nutrient FNI 210 used by *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) and the extracts of different plant species. Evaluation of the attractive and repellent potential of plant odors

ABSTRACT

The fruit fly is a major agricultural pest. In this work we determined the volatile composition of the nutrient FNI 210 (protein food) and extracts of five plants: *Cedronella canariensis*, *Eucalyptus globulus*, *Laurus novocanariensis*, *Myrtus communis* and *Ruta chalepensis* and evaluated its attractive and repellent potential in adult flies in a Y olfactometer. The volatile composition of the nutrient and the extracts was similar to that found by other authors and presented compounds attractive to the fruit fly.

In the olfactometer bioassays flies were attracted to protein but the mean percentage of responses varied with gender, sexual state, age, number of individuals per group being higher in individuals of 8 days old in groups of 5. Overall, virgin females responded more than non- virgins and more than virgin males. The number of insects that select the arm with protein was higher in the first repetition in the first 10 and 20 minutes. However, in all bioassays a large number of individuals did not respond.

In plant bioassays of the same group of 5 individuals of 8 days old insects response was tested three times in the olfactometer according to the following order: no sample, protein and plant extract. In all three cases the responses of adults varied according to sex and sexual condition. The mean percentages of responses to the extracts were higher than those obtained in tests without sample and smaller than those with protein, with exception of the extract of *L. novocanariensis* that presented an attractive potential higher than the protein in virgin males. In the tests with plant extracts, the responses to the arm with sample were superior than to the arm without sample, except for the response of virgin females to the extract of *R. chalepensis*, which suggests that this is the only plant repellent potential.

Keywords: Fruit fly, Attractive, Repellents, Plant extracts, Volatile compounds, Olfactometer.

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil Co-A	Acetil coenzima-A
AOS	Óxido de Aleno Sintetase
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CI	Ionização química
CO₂	Dióxido de carbono
C5	Hemiterpenos
C6; C9	5; 6 ou 9 Átomos de Carbono
C10	Monoterpeno
C15	Sesquiterpenos
CW/DBV	Carbomax/divinilbenzeno
DEET	N,N-dietil-2-metilbenzamida
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenzeno/carboxene/poli-dimetilsiloxano
DMAPP	Difosfato de dimetilalilo
EI	Ionização de eletrões
FNI 210	Nutriente ou Proteína alimentar
GC	Cromatografia gasosa
GC-qMs	Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (com analisador quádruplo)
GML	Modelo linear generalizado univariado
GPC	Proteínas G acopladas
GST	Glutathione-S-transferase
HPL	Hidroperóxido Liase
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência

HS-SPME	Microextração em fase sólida - Headspace
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IPP	Difosfato de isopentenilo
JA	Ácido Jasmónico
LC-Ms	Cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massa
LOX	Lipoxigenases
MAP	Mevalonato
MEP	Metil-eritriol-fosfato
MeJA	Éster metil jasmonato
NR	Não Respostas
O₃	Ozono
OBPs	Proteínas receptoras de odor
ORs	Recetores olfativos
ORNs	Neurónios de recetores olfativos
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno
RN	Respostas Negativas
RP	Respostas Positivas
SIT	Técnica do Inseto Estéril
SNC	Sistema nervoso central
TML	Trimedlure
TPSs	Terpeno sintetases
COVs	Compostos Voláteis

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABELAS.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Biologia e Órgãos Sensoriais de <i>Ceratitis capitata</i>	4
2.1.2 Órgãos Sensoriais.....	10
2.1.2.1 Tipos de Órgãos Sensoriais.....	10
2.1.2.2 Sistema Olfativo: Estrutura, Recepção e Resposta.....	12
2.1.2.2.5 Métodos para Avaliar a Resposta dos Insetos aos Compostos voláteis.....	18
2.2 Compostos Voláteis das Plantas: Composição, Biossíntese, Função, Emissão e Extração.....	22
2.2.1 Composição e Biossíntese dos Compostos Voláteis.....	22
2.2.1.3 Variação no Tipo de Compostos Consoante o Órgão da Planta.....	25
2.2.2 Funções dos Compostos Voláteis.....	25
2.2.2.1 Defesa Contra o Stress Abiótico.....	25
2.2.2.2 Defesa Contra o Stress Biótico.....	25
2.2.2.2.1. Efeitos Repelentes em Insetos.....	26
2.2.2.2.1.1 Plantas da Madeira com Efeitos Repelentes.....	28
2.2.3 Fatores que Afetam a Emissão de Compostos Voláteis.....	29
2.2.4 Aplicações Industriais dos Compostos Voláteis.....	32
2.2.5 Métodos de Extração, Quantificação e Análise dos Compostos Voláteis.....	32
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	39
3.1 Material Biológico.....	39
3.1.1 Insetos: Estirpe Utilizada e Métodos de Criação.....	39
3.1.2 Seleção e Recolha das Espécies de Plantas Utilizadas.....	39

3.2 Preparação, Extração e Análise dos Compostos Voláteis da Proteína e dos Extratos das Plantas	41
3.2.1. Preparação da Amostra e Extração dos Compostos Voláteis da Proteína	41
3.2.2. Preparação dos Extratos das Plantas e Extração dos Compostos Voláteis	41
3.2.3 Condições Utilizadas na Cromatografia Gasosa acoplado à Espectrometria de Massa (GC-QMS)	43
3.3 Bioensaios	44
3.3.1 Descrição e Funcionamento do Olfatómetro	44
3.3.2 Estandarização das Condições dos Bioensaios	45
3.3.2.1 Análise do Fluxo de Ar	45
3.3.2.2 Dispersão de Voláteis	45
3.3.3 Análise da Resposta dos Insetos	46
3.3.3.1 Manuseamento dos Insetos Utilizados nos Bioensaios	47
3.3.3.2 Condições dos Bioensaios	48
3.3.3.3 Análise da Resposta dos Insetos à Proteína Alimentar	48
3.3.3.4 Análise da Resposta dos Insetos aos extratos das plantas	50
3.4 Análise Estatística	51
4. RESULTADOS	53
4.1 Análise do Ar Com e Sem Amostra no Interior do Olfatómetro	53
4.1.2 Análise do Ar Sem Amostra	53
4.1.3 Análise dos Voláteis da Amostra em Vários Pontos do Olfatómetro	54
4.2 Proteína	55
4.2.1 Análise da Composição Volátil	55
4.2.2 Análise das Respostas dos Insetos	56
4.2.2.1 Comparação das Respostas Obtidas nas Três Repetições	57
4.2.2.2 Comparação das Respostas nos Dois Braços do Olfatómetro	61
4.2.3 Análise das Respostas Obtidas na Primeira Repetição	63
4.2.3.1. Análise das Respostas Positivas	64
4.2.3.2 Comparação das Respostas Positivas com as Respostas Negativas	70
4.2.3.3 Análise das Não Respostas	74

4.2.3.3 Influência do Estado Nutricional No Comportamento dos Insetos.....	78
4.3 Plantas	80
4.3.1 Análise da Composição Volátil.....	80
4.3.1.1 Composição Volátil dos Extratos Recolhidos das Folhas das Plantas	80
4.3.1.2 Compostos Voláteis Encontrados nas Plantas que Estimulam uma Resposta Atrativa em <i>C. capitata</i>	85
4.3.1.3 Odores dos Compostos Voláteis	88
4.3.2 Análise da Resposta dos Insetos nos Bioensaios das Cinco Espécies das Plantas.....	90
4.3.2.1 Olfatómetro Sem Amostra.....	90
4.3.2.2 Olfatómetro Com Amostra da Proteína Alimentar	95
4.3.2.3 Olfatómetro Com Amostra de Extratos de Plantas.....	98
5. DISCUSSÃO.....	106
6. CONCLUSÕES.....	123
7. BIBLIOGRAFIA.....	125
ANEXOS.....	153

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Etapas do ciclo de vida de <i>Ceratitis capitata</i> . a) ovo; b) larva; c) pupa; d e e) adultos machos e fêmeas, respetivamente.....	5
Figura 2: Resumo das vias biossintéticas envolvidas na biossíntese de compostos voláteis dentro das plantas.....	24
Figura 3: Técnica de Microextração em fase sólida em modo headspace (HS-SPME) [189].....	35
Figura 4: Diagrama típico do sistema GC-QMS [263].	37
Figura 5: Rampa de temperaturas utilizadas no GC-QMS na análise dos compostos voláteis presentes no fluxo de ar e nas amostras de trimedlure, proteína e extratos das plantas.....	43
Figura 6: Olfatómetro em forma de Y utilizado nos bioensaios. (1) bomba de vácuo; (2) carvão ativado; (3) água destilada; (4) (5) braços do olfatómetro; (6) centro.....	44
Figura 7: Olfatómetro em forma de Y. I) representação da direção da dispersão dos voláteis esperada dentro do olfatómetro; II) pontos dentro do olfatómetro de onde foram recolhidas as amostras de ar A=braço com amostra; B=braço sem amostra (controlo); C= centro do olfatómetro; D=base do olfatómetro.....	46
Figura 8: Caixas utilizadas durante a criação de adultos de <i>C. capitata</i>	47
Figura 9: Cromatogramas obtidos na análise dos compostos voláteis do (a) branco da fibra e do (b) ar retirado no centro olfatómetro.....	54
Figura 10: Cromatograma da composição volátil da proteína alimentar FNI 210 (Lallemand) obtido (a) na manhã (10:00h) e (b) na tarde (16:00h).....	56
Figura 11: Comparação da média das percentagens das respostas (positivas, negativas e não respostas) dos insetos nas três repetições (1 ^a , 2 ^a e 3 ^a) de acordo com o sexo (machos e fêmeas), idade (5, 8, 14 e 20 dias), estado sexual (virgens e não virgens) e número de indivíduos por grupo (5, 10, 15) independentemente do braço do olfatómetro onde foi colocada a amostra. As barras representam os valores médios \pm desvio padrão das percentagens de respostas.....	60
Figura 12 (continuação): Comparação da média das percentagens das respostas (positivas, negativas e não respostas) dos insetos nas três repetições (1 ^a , 2 ^a e 3 ^a) de acordo com o sexo (machos e fêmeas), idade (5, 8, 14 e 20 dias), estado sexual (virgens e não virgens) e número de indivíduos por grupo (5, 10,	

15) independentemente do braço do olfatómetro onde foi colocada a amostra. As barras representam os valores médios \pm desvio padrão das percentagens de respostas.....61

Figura 13: Valores médios das percentagens de respostas positivas obtidas na primeira repetição ao longo do tempo (10, 20, e 30 minutos) para os machos e fêmeas segundo o seu estado sexual (V=virgens e NV=não virgens) independentemente da idade e número de indivíduos por grupo.64

Figura 14: Percentagem média das respostas positivas obtidas na primeira repetição segundo a idade e independentemente do número de indivíduos por grupo. (A) Comparação das respostas dos machos e das fêmeas virgens (V); (B) comparação das fêmeas segundo o estado sexual (V= virgens e NV=não virgens).67

Figura 15: Valores médios das percentagens de respostas positivas obtidas na primeira repetição de acordo com o sexo (machos e fêmeas), idade (5, 8, 14 e 20 dias) e número de indivíduos por grupo (5, 10 e 15 dias). Os valores médios estão indicados nas Tabelas 16-18.....70

Figura 16: Valor médios das percentagens das respostas negativas à proteína obtidas na primeira repetição ao longo do tempo segundo o seu sexo e estado sexual (V=virgens e NV=não virgens), independentemente da idade, número de indivíduos por grupo.....71

Figura 17: Percentagens médias das respostas negativas para cada idade obtidas na primeira repetição de acordo com o sexo e estado sexual (V= virgens e NV=não virgens) dos indivíduos, independentemente do número de indivíduos por grupo.....73

Figura 18: Valores médios da percentagem das respostas negativas dos insetos obtidas na primeira repetição segundo o sexo (machos e fêmeas), o estado sexual (virgem, não virgem), a idade (5, 8, 14 e 20 dias) e o número de indivíduos por grupo (5, 10 e 15 dias). Os valores médios estão indicados nas Tabelas 15-17.....74

Figura 19: Valores médios da percentagem das não respostas à proteína obtidas na primeira repetição ao longo do tempo segundo o sexo e estado sexual (V=virgens e NV=não virgens), independentemente da idade e do número de indivíduos por grupo.75

Figura 20: Percentagens médias das não respostas à proteína obtidas na primeira repetição para as várias idades (5, 8, 14, e 20 dias) de acordo com o sexo e estado sexual (V= virgens e NV=não virgens), independentemente do número de indivíduos por grupo.....76

Figura 21: Valores médios das percentagens das não respostas à proteína obtidas na primeira repetição de acordo com o sexo, estado sexual (virgem, não virgem), idade (5, 8, 14 e 20 dias) e número de indivíduos por grupo (5, 10 e 15 dias). Os valores médios estão indicados na Tabela 7.77

Figura 22: Cromatogramas da composição volátil dos extratos recolhidos das folhas das plantas obtidos por GC-qMs.	80
Figura 23 (continuação): Cromatogramas da composição volátil dos extratos recolhidos das folhas das plantas obtidos por GC-qMs.	81
Figura 24: Percentagem de compostos voláteis obtidos nos extratos das cinco espécies plantas estudadas conhecidos por serem atrativos de <i>C. capitata</i> (ver compostos na Tabela 19). N.I: N.º de compostos voláteis onde a resposta de <i>C. capitata</i> não é conhecida; Resp. : N.º de compostos voláteis conhecidos por exercer resposta atrativa para <i>C. capitata</i>	86
Figura 25: Para cada família química é indicada a percentagem de compostos voláteis presentes nos extratos das cinco espécies de plantas estudadas conhecidos por estimular uma resposta atrativa em <i>C. capitata</i> . N.S: Percentagem de compostos voláteis para os quais a resposta de <i>C. capitata</i> não é conhecida; Resp.: Percentagem de compostos voláteis conhecidos por exercer resposta atrativa para <i>C. capitata</i>	87
Figura 26: Percentagem das áreas dos compostos voláteis que estimulam uma resposta atrativa na mosca da fruta para cada uma das cinco espécies de plantas N.S: Área dos total de compostos voláteis onde a resposta de <i>C. capitata</i> não é conhecida; Resp: Área do total de compostos voláteis atrativos para <i>C. capitata</i>	88
Figura 27: Número de compostos voláteis obtidos nos extratos das folhas das cinco espécies de plantas agrupados segundo a odor de acordo com os dados publicados.*Alcaravia: planta; Cânfora: planta; Terebentina: líquido obtido por destilação da resina de coníferas (diluente).	89
Figura 28: Percentagem média de respostas dos insetos dos dois sexos (virgens e não virgens) ao braço direito e ao braço esquerdo olfatómetro sem amostra obtidos nos bioensaios das 5 espécies de plantas. Aos insetos foi dada a hipótese de escolherem entre um dos dois braços do olfatómetro. As barras representam as médias das percentagens de resposta nos dois braços \pm o desvio padrão. Os símbolos ao lado das barras representam as diferenças entre as percentagens de decisão dos insetos que se deslocam entre o braço direito e o braço esquerdo determinado pelo teste Wilcoxon para os indivíduos do mesmo sexo e estado sexual em cada um dos bioensaios das plantas. Os símbolos no lado direito, fora das barras, representam as diferenças nas respostas obtidas no braço direito entre indivíduos de sexos diferentes e mesmo estado sexual (machos virgens e fêmeas virgens) ou entre indivíduos do mesmo sexo e diferente estado sexual (fêmeas virgens e fêmeas não virgens). Os símbolos no lado esquerdo, fora das barras, representam as diferenças entre as respostas obtidas no braço esquerdo entre indivíduos de sexos diferentes e mesmo estado sexual (machos virgens e fêmeas virgens) ou entre indivíduos do mesmo sexo e diferente estado sexual (fêmeas virgens e fêmeas não virgens). Os valores das duas	

margens laterais foram determinadas pelo GML. Abreviaturas n.s. ($p > 0,05$) não significativa; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$91

Figura 29: Comparação das respostas (positivas e negativas) dos insetos no olfatómetro sem amostra (branco) nos bioensaios com as cinco espécies de plantas ao longo do tempo (10, 20 e 30 minutos) de acordo com o sexo (♂ e ♀) e estado sexual: virgens (V) e não virgens (NV).94

Figura 30: Percentagem média de respostas dos insetos dos dois sexos (virgens e não virgens) ao braço direito do olfatómetro sem amostra e ao braço esquerdo do olfatómetro com amostra (1g de proteína alimentar) obtidos nos bioensaios das 5 espécies de plantas. Aos insetos foi dada a hipótese de escolherem entre um dos dois braços do olfatómetro. As barras representam as médias das percentagens de resposta nos dois braços \pm o desvio padrão. Os símbolos ao lado das barras representam as diferenças entre as percentagens de decisão dos insetos que se deslocam entre o braço direito e o braço esquerdo determinado pelo teste Wilcoxon para os indivíduos do mesmo sexo e estado sexual em cada um dos bioensaios das plantas. Os símbolos no lado direito, fora das barras, representam as diferenças nas respostas obtidas no braço direito entre indivíduos de sexos diferentes e mesmo estado sexual (machos virgens e fêmeas virgens) ou entre indivíduos do mesmo sexo e diferente estado sexual (fêmeas virgens e fêmeas não virgens). Os símbolos no lado esquerdo, fora das barras, representam as diferenças entre as respostas obtidas no braço esquerdo entre indivíduos de sexos diferentes e mesmo estado sexual (machos virgens e fêmeas virgens) ou entre indivíduos do mesmo sexo e diferente estado sexual (fêmeas virgens e fêmeas não virgens). Os valores das duas margens laterais foram determinadas pelo GML. Abreviaturas n.s. ($p > 0,05$) não significativa; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$96

Figura 31: Comparação das respostas (positiva e negativa) dos insetos à proteína alimentar nos diferentes bioensaios ao longo do tempo (10, 20 e 30 minutos) de acordo com o sexo (♂ e ♀) e estado sexual (V virgens e NV não virgens).....97

Figura 32: Percentagem média de respostas dos insetos dos dois sexos (virgens e não virgens) ao braço direito do olfatómetro sem amostra e ao braço esquerdo do olfatómetro com amostra (100 μ l de extrato de planta) obtidos nos bioensaios das 5 espécies de plantas. Aos insetos foi dada a hipótese de escolherem entre um dos dois braços do olfatómetro. As barras representam as médias das percentagens de resposta nos dois braços \pm o desvio padrão. Os símbolos ao lado das barras representam as diferenças entre as percentagens de decisão do insetos que se deslocam entre o braço direito e o braço esquerdo determinado pelo teste Wilcoxon para os indivíduos do mesmo sexo e estado sexual em cada um dos bioensaios das plantas. Os símbolos no lado direito, fora das barras, representam as diferenças nas respostas obtidas no braço direito entre indivíduos de sexos diferentes e mesmo estado sexual (machos virgens e fêmeas virgens) ou entre indivíduos do mesmo sexo e diferente estado sexual (fêmeas virgens

e fêmeas não virgens). Os símbolos no lado esquerdo, fora das barras, representam as diferenças entre as respostas obtidas no braço esquerdo entre indivíduos de sexos diferentes e mesmo estado sexual (machos virgens e fêmeas virgens) ou entre indivíduos do mesmo sexo e diferente estado sexual (fêmeas virgens e fêmeas não virgens). Os valores das duas margens laterais foram determinadas pelo GML. Abreviaturas n.s. ($p > 0,05$) não significativa; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ 100

Figura 33: Comparação das respostas (positiva e negativa) dos insetos à proteína alimentar nos diferentes bioensaios ao longo do tempo (10, 20 e 30 minutos) de acordo com o sexo (♂ machos e ♀ fêmeas) e estado sexual (V virgens e NV não virgens)..... 101

Figura 34: Percentagem média das respostas positivas obtidas para (1) o branco do olfatómetro; (2) a proteína alimentar e (3) os extratos das 5 espécies de plantas. As barras representam as percentagens médias das respostas positivas \pm o desvio padrão. Os símbolos à frente das barras (1) e (2) representam as diferenças encontradas nas respostas positivas dos mesmos indivíduos ao branco do olfatómetro e à proteína alimentar; os símbolos à frente das barras (2) e (3) representam as diferenças encontradas nas respostas positivas dos mesmos indivíduos entre a proteína alimentar e o extrato da planta; os símbolos nas barras representam as diferenças encontradas entre as respostas positivas dos mesmos indivíduos entre o (1) branco do olfatómetro e o (3) extrato da planta. As diferenças entre as respostas positivas dos insetos foram determinadas pelo teste Wilcoxon. Abreviaturas n.s. ($p > 0,05$) não significativa; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ 103

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:Resumo das características das várias fases do ciclo biológico de *C. capitata* a 25 ± 2 °C.....6

Tabela 2:Resumo dos compostos voláteis que estimulam uma resposta em *Ceratitis capitata* indicando as características dos insetos e a localização dos compostos obtido a partir de dados publicados em bioensaios com condições das moscas: (CL) Criadas em Laboratório; (S) Selvagens; Resposta dos insetos: (-) Menor Resposta, (+) Resposta intermédia; (+++) Maior Resposta e (*)Compostos presentes no odor libertado pelos machos; Localização do volátil (fruto ou planta). 15

Tabela 3 (continuação):Resumo dos compostos voláteis que estimulam uma resposta em *Ceratitis capitata* indicando as características dos insetos e a localização dos compostos obtido a partir de dados publicados em bioensaios com condições das moscas: (CL) Criadas em Laboratório; (S) Selvagens; Resposta dos insetos: (-) Menor Resposta, (+) Resposta intermédia; (+++) Maior Resposta e (*)Compostos presentes no odor libertado pelos machos; Localização do volátil (fruto ou planta)..... 16

Tabela 4 (continuação):Resumo dos compostos voláteis que estimulam uma resposta em <i>Ceratitis capitata</i> indicando as características dos insetos e a localização dos compostos obtido a partir de dados publicados em bioensaios com condições das moscas: (CL) Criadas em Laboratório; (S) Selvagens; Resposta dos insetos: (-) Menor Resposta, (+) Resposta intermédia; (+++) Maior Resposta e (*)Compostos presentes no odor libertado pelos machos; Localização do volátil (fruto ou planta).....	17
Tabela 5: Alguns dos compostos voláteis de plantas mais conhecidos por terem efeitos repelentes contra espécies da ordem Díptera segundo os dados publicados.	27
Tabela 6: Algumas plantas exóticas e endémicas da Madeira que apresentam efeito repelente nos insetos [238-240] segundo a parte da planta e a sua origem. Abreviaturas: I-Introduzida; N-Nativa; End.: Endémica da Madeira; Mac.-Endémica da Macaronésia.....	28
Tabela 7 (continuação): Algumas plantas exóticas e endémicas da Madeira que apresentam efeito repelente nos insetos [238-240] segundo a parte da planta e a sua origem. Abreviaturas: I-Introduzida; N-Nativa; End.: Endémica da Madeira; Mac.-Endémica da Macaronésia.	29
Tabela 8: Tipos de estruturas secretoras de substâncias voláteis presentes nas diferentes famílias de plantas [241].	30
Tabela 9: Características das fibras disponíveis comercialmente segundo, a sua espessura, polaridade e o tipo de compostos a extrair [259].	35
Tabela 10: Características das plantas utilizadas nos bioensaios.....	40
Tabela 11: Resumo dos principais equipamentos utilizados.	42
Tabela 12:Tempo de retenção e área dos compostos voláteis encontrados na fibra (branco da fibra) e no ar sem amostra retirado no centro do olfatómetro com as suas características químicas.	53
Tabela 13: Compostos voláteis da proteína alimentar FNI210 (Lallemand) Características dos obtido (a) na manhã (~10:00h) e (b) na tarde (~16:00h).	55
Tabela 14: Resultados da comparação das percentagens médias das respostas (positivas, negativas e não respostas) dos insetos à proteína alimentar após três repetições (1ª, 2ª e 3ª) do mesmo bioensaio obtidos através do modelo linear generalizado univariado (GML). As comparações foram realizadas para bioensaios com indivíduos do mesmo sexo, estado sexual, idade e mesmo número de indivíduos por grupo, independentemente do braço do olfatómetro onde foi colocada a amostra de proteína alimentar.	58
Tabela 15: Resumo dos valores médios mais elevados das percentagens de respostas (positivas, negativas e não respostas) dos machos e fêmeas virgens (V) e não virgens (NV) à proteína alimentar	

obtidos em cada uma das três repetições. Os valores médios mais elevados apresentados foram calculados para bioensaios com indivíduos do mesmo sexo, estado sexual, idade e mesmo número de indivíduos por grupo.59

Tabela 16: Resultados da comparação da percentagem média das respostas (positivas e negativas) à proteína alimentar observadas na primeira repetição nos dois braços do olfatómetro (direito ou esquerdo) segundo o modelo linear generalizado univariado (GML). A análise estatística foi realizada para bioensaios com indivíduos do mesmo sexo, estado sexual, idade e número de indivíduos por grupo.62

Tabela 17: Comparação da percentagem média das respostas (positivas, negativas e não respostas) dos insetos à proteína alimentar ao longo do tempo (10, 20 e 30 minutos) na primeira repetição através do modelo linear generalizado univariado (GML). A análise estatística foi calculada para bioensaios com indivíduos do mesmo sexo, estado sexual, idade e número de indivíduos por grupo.65

Tabela 18: Valores médios das percentagens de respostas (positivas, negativas) e não respostas dos machos virgens à proteína alimentar na primeira repetição. Valores obtidos de acordo com a idade (5, 8, 14 e 20 dias) e mesmo número de indivíduos por grupo (5, 10 e 15).66

Tabela 19: Valores médios das percentagens de respostas (positivas, negativas e não respostas) das fêmeas virgens à proteína alimentar na primeira repetição. Valores obtidos de acordo com a idade (5, 8, 14 e 20 dias) e mesmo número de indivíduos por grupo (5, 10 e 15).68

Tabela 20: Valores médios das percentagens das respostas (positivas, negativas e não respostas) das fêmeas não virgens à proteína alimentar na primeira repetição. Valores obtidos de acordo com a idade (5, 8, 14 e 20 dias) e mesmo número de indivíduos por grupo (5, 10 e 15).69

Tabela 21: Valores médios das percentagens de respostas obtidos nos bioensaios ao branco do olfatómetro, ao longo do tempo (10, 20 e 30 minutos) de acordo com o seu estado nutricional. Abreviaturas: V= virgens e NV= não virgens. BD= Braço Direito; BE=Braço Esquerdo. Não Resp= Não Respostas.78

Tabela 22: Compostos voláteis maioritários encontrados nos extratos das folhas das cinco espécies plantas estudadas obtidos por GC-qMs. Estão indicados em cada caso o nome do composto, o índice de Kovacs (IK), o número CAS, a área do composto obtido no extrato da planta (A_A), a área relativa do composto calculado com base nas cinco espécies de plantas (A_{RP}) e compostos voláteis conhecidos por estimular resposta atrativa para *C. capitata*(*).....82

Tabela 23 (continuação): Compostos voláteis maioritários encontrados nos extratos das folhas das cinco espécies plantas estudadas obtidos por GC-qMs. Estão indicados em cada caso o nome do composto, o índice de Kovacs (IK), o número CAS, a área do composto obtido no extrato da planta (A_A), a área relativa

do composto calculado com base nas cinco espécies de plantas (A_{RP}) e compostos voláteis conhecidos por estimular resposta atrativa para *C. capitata*(*).....83

Tabela 24: Famílias químicas principais às quais pertencem os compostos voláteis obtidos da análise dos extratos recolhidos das folhas das plantas. Na categoria *outros* foram incluídos os compostos de azoto, enxofre e furanos. Os valores indicados correspondem à percentagem das áreas obtidas por GC-qMs de cada um dos compostos obtidos em cada extrato de planta.84

Tabela 25:Valores médios das percentagens de respostas com os mesmos insetos obtidos nos bioensaiois ao branco do olfatómetro, proteína alimentar e extrato da planta ao longo do tempo (10, 20 e 30 minutos). Abreviaturas: V= virgens e NV= não virgens. RP= resposta positiva; RN= resposta negativa.92

Tabela 26: Valores médios das percentagens de respostas com os mesmos insetos obtidos nos bioensaiois ao branco do olfatómetro, proteína alimentar e extrato da planta. Abreviaturas: V= virgens e NV= não virgens. RP=resposta positiva; RN= resposta negativa, NR=não respostas, RP/RN=valor de respostas positivas sobre o valor de respostas negativas, RP/NR= valor de respostas positivas sobre o valor de não respostas, R/NR= valor de respostas (positivas+negativas) sobre o valor de respostas negativas. 104

1. INTRODUÇÃO

A família Tephritidae inclui muitas espécies de moscas que são pragas de culturas de frutos em todo o mundo. As espécies que constituem as pragas economicamente mais importantes pertencem aos géneros de *Anastrepha* Schiner, *Bactrocera* Macquart, *Ceratitis* Macleay e *Dacus* Fabricius. O género *Ceratitis* engloba cerca de 78 espécies, entre elas a espécie *Ceratitis capitata* (Wiedmann, 1824) é considerada a praga com maior incidência [1 - 3].

A mosca da fruta ou mosca do mediterrâneo *Ceratitis capitata* é extremamente polífaga, capaz de atacar mais de 250 variedades de frutos e vegetais [4,5]. Esta mosca registou-se pela primeira vez como praga contra o desenvolvimento da fruticultura da Madeira em 1829, sendo hoje, capaz de atacar mais de 40 espécies de diferentes frutos, além dos seus hospedeiros primários (ex. pêssago, goiaba) também pode ocorrer em hospedeiros secundários como plantas hortícolas [6, 7].

A Madeira pela sua orografia é pouco apropriada para a produção agrícola em grande escala, no entanto, a produção em pequena escala é importante para as populações locais. Na costa norte da ilha, entre os 700 m aos 1800 m de elevação, a temperatura é geralmente mais baixa, com chuvas e ventos fortes e abundantes, e aqui este inseto causa poucos estragos porque os frutos que surgem no inverno ou no princípio da primavera escapam ao seu ataque [6, 7]. No entanto, na costa norte e sul dos 0 m aos 700 m de elevação, principalmente até aos 600 m, as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento da mosca da fruta, e portanto os frutos são fortemente infestados durante todo o ano [6], sendo que em média por ano os danos causados estimados em cerca de 2,5 milhões [7].

A fêmea é a responsável pelos prejuízos causados nos frutos devido às picadas efetuadas aquando da colocação dos ovos e posterior alimentação larval. As picadas podem ainda facilitar a infestação dos frutos por agentes patogénicos como os fungos e as bactérias ou podem provocar a queda dos mesmos antes de estes terem atingido a sua maturação fisiológica. Mas, é na fase larval que o inseto causa os maiores prejuízos, a larva destrói a polpa dos frutos ou as suas porções sucosas. Além disso, as marcas resultantes da oviposição afetam a estética do fruto reduzindo a sua qualidade no mercado e provocando graves danos económicos [6].

O estudo das características genéticas têm vindo a evidenciar a África como o local de origem desta mosca [8]. Desde aqui, este inseto terá alargado a sua área de distribuição por outros continentes. Com frequência a dispersão desta espécie tem sido auxiliada inconscientemente pelo homem através do transporte de frutos infestados com ovos e/ou larvas. Além disso, este inseto apresenta um grande potencial invasivo devido à sua capacidade de adaptar-se com facilidade a novos habitats tropicais e temperados, ao elevado número de gerações anuais e ao elevado número de plantas hospedeiras onde se podem desenvolver [6, 8]. A primeira vez que *C. capitata* foi identificada como praga de frutos foi em

1829 por Macleay após ter sido enviada dos Açores para a Inglaterra [9, 10]. Em menos de 100 anos esta espécie expandiu-se por todas as áreas continentais, primeiro pela Europa (1842), Austrália (1897), nova Zelândia (1901), Egito (1904), Ásia (1904) e América (1955) [8,10].

Desde o conhecimento desta mosca como praga agrícola, muito esforço tem sido despendido na tentativa de controlar as populações na natureza. Tanto na Madeira como a nível mundial, o controle desta praga tem sido tradicionalmente realizada através da utilização de produtos químicos e da técnica do inseto estéril (SIT) [11, 12]. A SIT baseia-se na produção em massa de machos esterilizados. Estes são libertados periodicamente em áreas onde a praga existe de forma a procurar o acasalamento com fêmeas selvagens, tornando assim os seus ovos inviáveis e evitando desta forma a geração de descendentes. Para que esta técnica seja bem-sucedida é necessária a monitorização efetiva do número de indivíduos antes e após a largada de insetos estéreis para verificar se houve ou não decréscimo na população. No entanto, esta técnica apresenta algumas desvantagens entre as quais se podem destacar (i) elevados custos de produção e irradiação de machos para torná-los estéreis; (ii) o sucesso da técnica está dependente da capacidade dos machos estéreis em acasalar com as fêmeas selvagens e (iii) as fêmeas devem acasalar-se de preferência apenas uma única vez durante toda a sua vida [12, 13].

Por estas razões e também porque a comercialização de muitos produtos químicos (agrotóxicos) utilizados contra a mosca da fruta estarem a ser proibidos devido aos sérios problemas que podem causar na natureza e na saúde pública, tornou-se necessário o desenvolvimento de métodos alternativos [14].

A utilização de produtos naturais para o controlo de *C. capitata* é uma alternativa que tem vindo a despertar o interesse de muitos pesquisadores. Entre estes destacam o uso de substâncias naturais como óleos essenciais ou extratos de plantas que possam atuar de diferentes formas, como inseticida ou repelentes [14]. Algumas dessas pesquisas incluem extratos da casca de *Citrus aurantium* L. recolhidos com éter de petróleo [15], óleos essenciais extraídos de *Thymus capitatus* L., *Thymus herba-barona* Loisel, *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L., *Cinnamomum zeylanicum* Nees [16] e *Ocimum basilicum* L. e os seus compostos maioritários (trans-anethole, estragole e linalol) [17] os quais foram adicionados na alimentação dos adultos para ver o seu efeito inseticida. A formulação comercial de nem obtida de *Azadirachta indica* A. foi adicionada em diferentes concentrações na alimentação dos adultos para verificar os efeitos sobre a fecundidade e longevidade [18]. Extratos da casca do limão *Citrus limon* L. obtidos com diferentes solventes (éter dietil, acetato de etilo e metanol) foram adicionados à dieta natural das larvas e à alimentação das fêmeas para verificar o seu efeito inseticida [19]. Óleos essenciais de 3 espécies de frutos de *Citrus sinensis* L., *C. limon* L. e *C. aurantium* L. também foram adicionados na alimentação das larvas para verificar o seu efeito inseticida [20]. Diferentes concentrações do óleo de marmeleiro *Croton grewioides* Baill foram aplicados nas pupas para avaliar a sua emergência [21]. O composto p-vinilfenil isolado de *Elaphoglossum piloselloides* C. Presl. foi testado para verificar o seu

efeito no comportamento das fêmeas durante a oviposição [22]. Os óleos essenciais recolhidos de *Tagetes minuta* L., *Tagetes rupestres* Cabrera, *Tagetes terniflora* Kunth e *Tagetes filifolia* Lag. foram utilizados para avaliar a sua toxicidade e resposta olfativa nos adultos de *C. capitata* [23]. Diferentes concentrações do produto Proagrim (componente mineral enriquecido com 1% de óleo de *Azadirachta indica* A.), e óleos essenciais de *Foeniculum vulgare* Mill. e *Citrus sinensis* L. foram aplicados sobre frutos para verificar o seu efeito inibitório ou repelente na oviposição das fêmeas e no desenvolvimento das larvas [14].

Da pesquisa efetuada consta-se que são poucos os trabalhos com *C. capitata* onde tenha sido testada a atividade atrativa/repelente de óleos essenciais ou extratos de plantas. Assim, e de modo a procurar novos atrativos e repelentes, foi desenvolvido este estudo. Os objetivos deste trabalho foram essencialmente dois. O primeiro extrair e identificar os componentes voláteis do nutriente FNI 210, conhecido por ser uma proteína alimentar utilizada na alimentação dos insetos, e de diferentes plantas da Madeira conhecidas por serem repelentes para diversas espécies de insetos. Como técnica analítica extrativa para isolar os metabolitos voláteis foi escolhida a microextração em fase sólida em modo de headspace (HS-SPME) combinada com a cromatografia gasosa hifenada à espetrometria de massa (GC-MS) para a separação e identificação dos metabolitos. O estabelecimento da composição volátil das diversas plantas em análise possibilitará a sua diferenciação bem como o conhecimento dos compostos maioritários e mais representativos de cada uma delas.

O segundo objetivo foi testar a sua atividade biológica (efeito atrativo ou repelente) do nutriente FNI 210 e dos extratos das plantas no comportamento da mosca da fruta em insetos criados em laboratório utilizando um olfatómetro em forma de Y. Para aferir os possíveis efeitos do olfatómetro e outros parâmetros no comportamento das moscas, foram realizados diversos testes de modo a standardizar as condições ambientais de realização dos testes (luminosidade, temperatura e humidade), as características das moscas (sexo, idade e estado sexual); as condições do olfatómetro (posição, fluxo de ar e fundo) e as características dos bioensaios (número de moscas por ensaio, tempo de duração e número de réplicas).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biologia e Órgãos Sensoriais de *Ceratitis capitata*

2.1.1 Caraterísticas Biológicas

2.1.1.1 Ciclo de Vida

Ceratitis capitata apresenta um ciclo de vida constituído por 4 estádios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto com diferente duração em cada um deles (Tabela 1).

- **Ovo** - branco e translúcido (Fig. 1 a) com cerca de 1,0 mm de comprimento e cerca 0,23 mm de largura [6]. É colocado pela fêmea geralmente no interior de um fruto. A fase de ovo dura cerca de 2 a 5 dias, variando consoante as condições climáticas [24].
- **Larva** – reside na parte polposa do fruto. É de cor branco. A fase larval tem três estádios de tamanhos diferentes. Quando atinge o desenvolvimento larvar, a larva salta do fruto para o solo onde se enterra para iniciar a nova fase de pupa (Fig. 1 b). Os saltos podem atingir um comprimento de 20 cm e uma altura de 15 cm [24]. Nesta fase as larvas são vulneráveis ao ataque de predadores (ex. formigas e parasitóides) [25 – 27]. A fase larval dura cerca de 10 a 19 dias, variando consoante as condições climáticas e o estado de maturação e ou conservação do fruto [24].
- **Pupa** – de cor castanho (Fig. 1 c), mede cerca de 2,75 a 4,85 mm de comprimento e tem 1,6 a 2,4 mm de largura; estas dimensões dependem do tamanho que a larva chega a atingir no final do terceiro estágio de desenvolvimento [24]. No momento em que as pupas atingem o solo, penetram até uma profundidade de cerca de 5 cm. Esta profundidade muitas vezes não é suficiente para proteger a pupa de temperaturas extremas (frio ou calor) e dos predadores (ex. formigas e parasitóides), sendo por isso, estas as principais causas da mortalidade de pupas [27]. A fase de pupa varia de 6 a 13 dias [25] dependendo das condições ambientais, composição solo e teor de humidade [24, 28, 29].

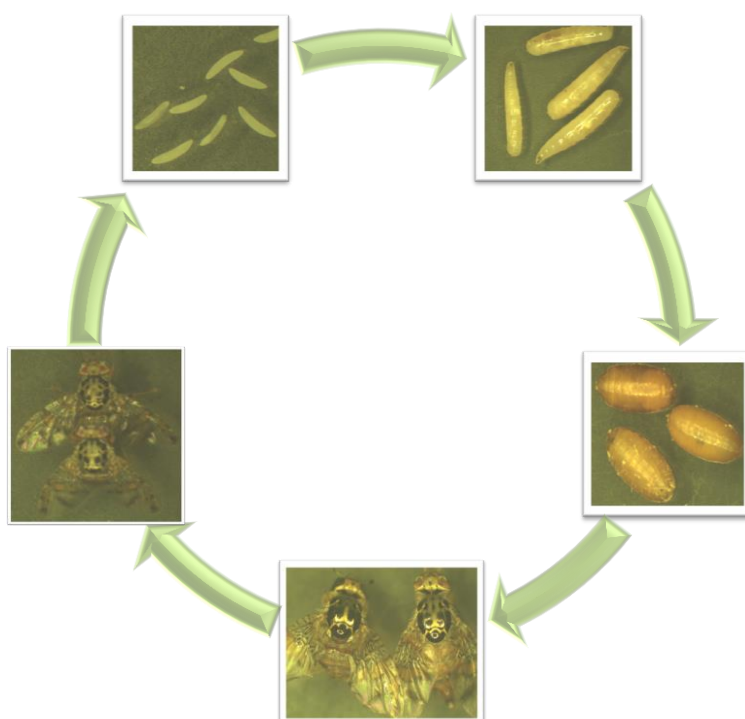
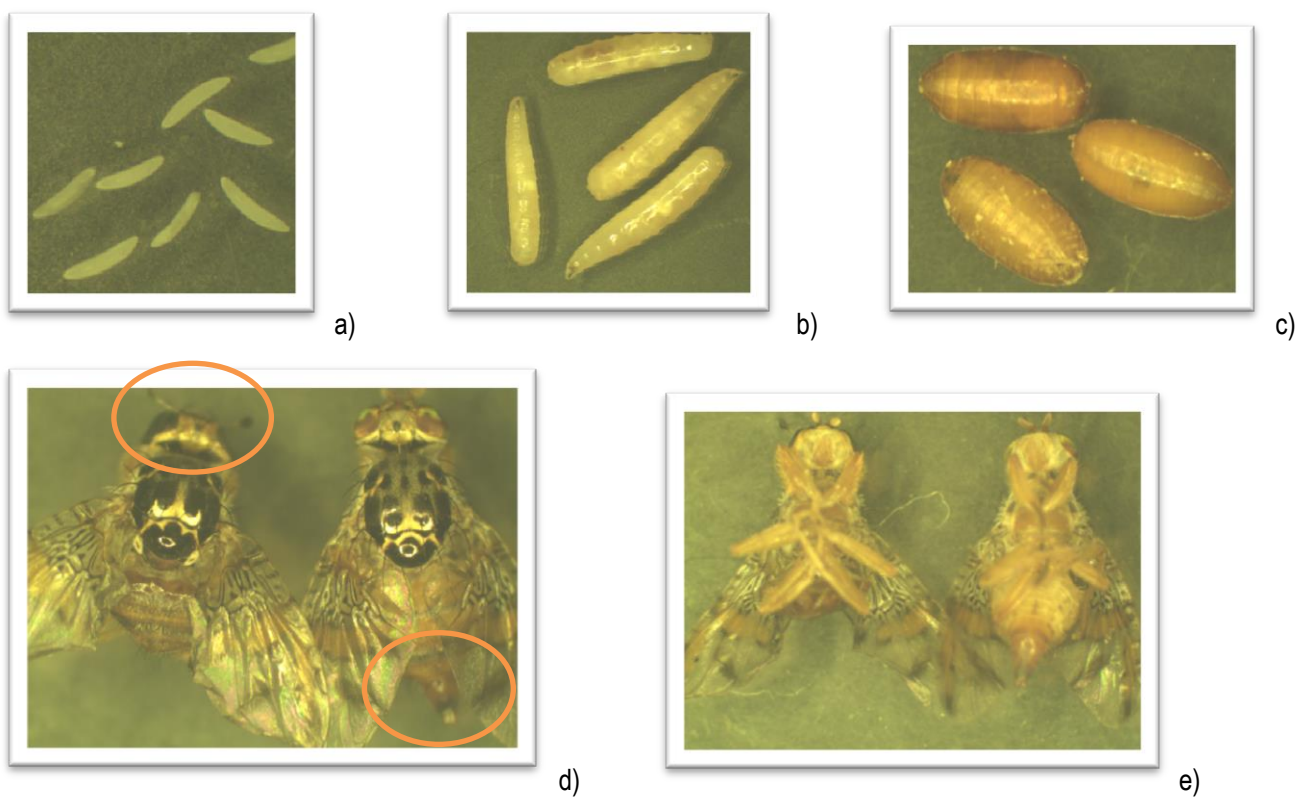


Figura 1: Etapas do ciclo de vida de *Ceratitidis capitata*. a) ovo; b) larva; c) pupa; d e e) adultos machos e fêmeas, respetivamente.

- **Adulto** – é de cor amarelo – acinzentado e tem um comprimento que varia de 3 a 6 mm [24]. Na fase de larva e pupa não apresenta dimorfismo sexual, e portanto, já nos adultos, machos e fêmeas podem distinguir-se quanto à diferenças entre as regiões cefálica e abdominal [24] (Fig. 1 d). Os machos apresentam um par de sedas espatuladas na região fronto-orbital anterior. As fêmeas não possuem um par de sedas e apresentam um abdómen um pouco mais comprido e pontiagudo do que os machos [24]. O maior tamanho do abdómen das fêmeas é atribuído à capacidade em produzir e armazenar ovos [30]. A longevidade dos adultos depende principalmente da alimentação e das condições climáticas [31 – 33].

Tabela 1:Resumo das características das várias fases do ciclo biológico de *C. capitata* a 25±2 °C.

Fase	Caraterísticas	Valores	Ref.
Ovo	Período de Incubação	2-5 dias	[24, 33]
	Número de ovos por fêmea	300 a 1000; média de 700	[31, 34]
Larva	Duração do período larvar	10-19 dias	[33]
Pupa	Duração do período pré-pupal (tempo que a larva demora até formar pupa)	3-68 h	[24]
	Profundidade do solo a que se enterram as larvas antes de pupar	Até cerca de 5 cm	[28]
	Duração do desenvolvimento da pupa	6-13 dias	[33]
Adulto	Idade a que atingem a maturidade sexual (disponibilidade de emitir ou receber o estímulo que leva à corte)	48h após eclosão	[35]
	Idade a que atingem a maturidade reprodutiva (esperma móvel ou presença de ovos)	♂♂ logo após eclosão; ♀♀ 4 dias após eclosão;	[35]
	Número e vezes que copulam durante a vida	♀♀ 1 ou várias ♂♂ várias	[36 – 38]
	Duração da cópula	144 a 179 minutos; média de 2,5 h	[24, 39]
	Ovos por postura	3 a 7 média é de 4	[24]
	Posturas por dia	média de 3	[24]
	Longevidade dos adultos (machos e fêmeas)	40 a 60 dias	[33, 40]

1.1.1.2 Acasalamento

Em geral, durante a reprodução de *C. capitata* existe competição entre machos pelas fêmeas, existem ainda rituais de namoro, seguindo-se a cópula, a inseminação e por fim, uma vez fertilizados os ovos decorre a oviposição.

Após eclosão, que geralmente ocorre sobre a madrugada [29, 41] os adultos passam por um período de pré-fecundação antes da primeira cópula. A duração deste período depende essencialmente das condições climáticas e da natureza dos alimentos ingeridos [24]. Em condições naturais normalmente os machos são os primeiros a atingirem a maturidade sexual, e posteriormente, formam leks ou grupos de 3 ou 4 indivíduos [39, 42 - 44] para defender folhas individuais, ramos ou frutos da planta hospedeira como o seu território de acasalamento [45, 46] A escolha da árvore e do local dentro da árvore para o acasalamento varia em função das condições climáticas (temperatura, humidade e intensidade da luz), do risco de predação, dos recursos nutricionais disponíveis e da presença de outros machos [45, 47].

Uma vez selecionado o local, os leks de machos emitem sinais de acasalamento para atrair as fêmeas. Estes sinais consistem em sinais auditivos (zumbido), sinais visuais (batimentos vigorosos das asas) e sinais olfativos (feromona sexual) [48]. Muitas vezes, os machos competem com machos rivais pelo acesso às fêmeas. Após a chegada da fêmea, o macho acrescenta aos sinais anteriores ainda estímulos táteis [49 – 51]. A escolha do macho para a cópula é feita pela fêmea. Durante a cópula o macho sobe no dorso da fêmea e executa vários movimentos, cuja função está relacionada com a transferência dos seus espermatozoides. Estes ficam armazenados na espermateca e são nutridos e mobilizados quando necessário para a fertilização dos ovos na altura de oviposição [49].

A duração da cópula é variável, em média dura cerca de 2 h e 30 minutos [24, 52] e está positivamente associada tanto à quantidade dos espermatozoides armazenados na fêmea [53], e ainda com o estado nutricional dos adultos [54]. As cópulas ocorrem geralmente no início da manhã e ao final da tarde [55]. Os machos podem acasalar muitas vezes, enquanto, que as fêmeas podem acasalar várias vezes ou apenas uma única vez durante toda a vida, dependendo se a cópula foi ou não eficaz na transferência de espermatozoides para a sua espermateca [36 – 38].

1.1.1.3 Oviposição

Um comportamento decisivo para a oviposição é a escolha da planta hospedeira. A planta hospedeira deverá ser adequada para o desenvolvimento da larva, uma vez que esta não tem mobilidade e depende para a sua sobrevivência dos recursos nutricionais fornecidos pela planta selecionada pela fêmea adulta [40, 56 – 58]. A escolha do hospedeiro pela fêmea ainda não está bem compreendida, no entanto, uma conjugação de propriedades físicas e químicas do fruto como sinais visuais, olfativos e ainda o valor nutricional permitem à fêmea selecionar o melhor fruto para colocação dos ovos [29]. *C. capitata* apresenta elevada flexibilidade quanto aos locais de postura selecionados o que se reflecte na capacidade de colonizar diversos habitats e aceitar como hospedeiros até mesmo frutas que são incapazes de permitir o desenvolvimento larval na ausência de outras [40, 59].

Após o acasalamento e antes de iniciar as posturas a fêmea passa por um período de pré-oviposição variável dependendo das condições climáticas e da existência de hospedeiros. Durante este período a fêmea procura os frutos mais aromáticos e polposos para efectuar a postura [24]. Quando os frutos numa determinada região se tornam escassos a competição entre as fêmeas pelas frutas restantes é intensa. As fêmeas têm a capacidade de se dispersar rapidamente, às vezes, dispersam-se por longas distâncias em busca de novas plantas hospedeiras com frutos acetáveis [59]. Para localizar um fruto individual as fêmeas utilizam uma variedade de características morfológicas como a forma, o tamanho e a cor. No geral preferem frutos grandes, com forma circular e com cores variando de amarelo a esverdeado [60, 61].

Após a fêmea pousar sobre o fruto, avalia se este é ou não aceitável para a colocação dos seus ovos. Para isto utiliza estímulos táteis com base nas características físicas da superfície do fruto (estrutura da superfície e estado de maturação); características químicas perceptíveis por estímulos olfativos (composição volátil do fruto [62]) e ainda presença/ausência de outras feromonas [63]). Este comportamento é importante para o desenvolvimento larval e aptidão dos adultos [64].

A fêmea depois de terminada uma oviposição pode iniciar outra. Uma fêmea é capaz de colocar cerca de 3 posturas por dia [24] atingindo cerca de 300 a 1000 posturas ao longo da sua vida [34]. As posturas muitas vezes estão influenciadas pelo tamanho dos frutos disponíveis e pelas variações de temperatura durante o ano. A oviposição ocorre periodicamente em todas as horas do dia mas sobretudo à tarde [24].

Para evitar o aumento da densidade de larvas dentro do mesmo fruto e assim facilitar o desenvolvimento da sua descendência, as fêmeas são capazes de proteger os seus locais de oviposição através da marcação desse local por uma feromona afastando assim outras fêmeas [65, 66].

1.1.1.4 Alimentação

Os adultos alimentam-se das exsudações dos frutos, da seiva saída das feridas das partes verdes vegetais, do néctar das flores ou das fezes de aves que representam uma fonte rica em proteínas [67 – 69]. O alimento mais utilizado é o suco que sai dos frutos, principalmente dos frutos maduros, já que são muito ricos em hidratos de carbono, ácidos gordos e proteínas [24]. A fim de realizar as suas atividades biológicas como a reprodução são necessárias quantidades consideráveis destes compostos. Outros nutrientes como sais minerais e vitaminas também são também essenciais para a reprodução [29, 70].

As larvas alimentam-se da polpa do fruto e têm a capacidade de nele distinguir e migrar para as partes mais nutritivas [58, 71]. Muitas vezes as suas capacidades metabólicas podem compensar a falta de recursos adequados no ambiente, já que nutrientes essenciais podem ser consumidos durante a fase larvar e serem posteriormente transferidos para as fases de pupa e adulta. Estes nutrientes podem ainda ser sintetizados *de novo* após a ingestão dos precursores adequados [72 - 73]. Geralmente, os adultos quando eclodem têm quantidades variáveis de reservas de nutrientes que vão depender da qualidade nutricional do fruto onde a larva se desenvolveu [40, 57, 74].

1.1.1.4.1 Hidratos de Carbono e Ácidos Gordos

Os açúcares são fontes de energia que permitem a mosca desenvolver as suas atividades como, voar, fugir, acasalar, entre outras [75]. Por outro lado, os açúcares também servem como substrato para a lipogénese, já que os lípidos não estão disponíveis na dieta natural das moscas [76]. Segundo Gothilf [77] as moscas apresentam a capacidade de distinguir açúcares com concentrações variáveis. Esta capacidade permite-lhes ajustar a ingestão de soluções de sacarose de acordo com a sua concentração, alimentando-se de grandes quantidades quando a sacarose está pouco concentrada ou de pequenas quantidades quando esta está muito concentrada [78].

1.1.1.4.2 Proteínas

Desempenham um papel importante na aptidão e sucesso reprodutivo da mosca [30]. De acordo com Plácido-Silva [30] as necessidades do consumo de proteína são semelhantes tanto em machos como em fêmeas e o seu consumo é tão importante nos estados imaturos como também no estado adulto. Durante a fase larvar, a ingestão de alimento proteico é importante para o crescimento, sobrevivência, armazenamento de material nutritivo para a fase de pupa e utilização durante a fase adulta. O consumo de proteína na fase adulta parece ser essencial na formação das glândulas sexuais, produção de feromonas e outros aspectos que podem influenciar o desempenho sexual [30].

No caso dos machos, o consumo de proteína em quantidades adequadas torna-os sexualmente mais ativos [79 – 81], além disso, a participação dos machos em *leks* também é regulada pelas reservas de proteína e hidratos de carbono [82]. No caso das fêmeas o consumo de proteína aumenta a produção de ovos [30, 67, 76].

A falta de um alimento proteico interfere na duração do ciclo de vida, na emergência e no tamanho do adulto [83]. Tanto as larvas como os adultos são capazes de discriminar dietas com maior valor nutricional e de selecionar os alimentos, sendo capazes de optar por dietas que apresentem maior concentração de proteínas [30, 71]. A procura por um alimento rico em proteínas poderá ser um fator de dispersão dos adultos para um novo habitat [84].

1.1.1.4.2.1 Proteínas Comerciais

A atração das moscas para fontes de proteína tem sido explorada como métodos de controlo utilizando proteínas na forma de iscas combinadas com inseticidas e/ou armadilhas [83, 85 – 86]. As iscas proteicas comercializadas são produtos obtidos a partir da hidrólise parcial de proteínas e podem ser produzidas a partir de várias fontes (ex. produtos de levedura ou fermentação) [88, 89]. A maioria das iscas proteicas são fornecidas na forma de líquidos acastanhados (Nu-Lure, Buminal ou Solulys) ou na forma de pó (FNI210 ou FNIL65), ambas as formas contêm quantidades variáveis de proteína bruta [90]. A amónia é o produto final da decomposição da proteína, e é conhecido como o composto que exerce maior atração das moscas [91]. Existe uma correlação entre a concentração de amónia e a resposta das moscas sendo as condições ideais de amónia uma concentração entre 0,01 M e 0,0075 M e uma taxa de libertação 5,28 µg/cc/h [92]. A taxa de libertação varia dependendo das interações entre os factores bióticos (acção microbiana) e abióticos (temperatura, precipitação, vento, etc.) [90]. Os adultos com idades entre os 3 e os 12 dias são mais propensos a serem atraídos por estas armadilhas, no entanto, além da amónia, há outros factores como aminas, ácidos gordos entre outros voláteis que podem ser responsáveis por esta atratividade [29, 93].

2.1.2 Órgãos Sensoriais

Os tefritídeos utilizam diferentes estímulos (mecânicos, visuais, químicos) para procurar e avaliar o tipo habitat de alimento, assim como desencadear o acasalamento e a escolha do local de oviposição [94 – 98]. Os órgãos sensoriais são responsáveis pela recepção e transmissão de estímulos através de impulsos nervosos até o cérebro que depois se vão traduzir em diferentes padrões de comportamento. Os órgãos sensoriais são constituídos por grupos de células associadas a estruturas tegumentares auxiliares, externas ou internas, com elevada especificidade designadas por sensilas [99].

2.1.2.1 Tipos de Órgãos Sensoriais

De acordo com o tipo de estímulo externo recebido, os órgãos sensoriais (sensilas) dos insetos podem classificar-se em mecanorreceptores, receptores de temperatura e humidade, fotorreceptores e quimiorreceptores [100].

- **Mecanorreceptores:** órgãos que respondem ao sentido de tato, vibração, orientação e audição, devido ao contato com objetos externos sólidos, correntes de ar ou água, vibrações de baixa frequência transmitidas por um suporte sólido ou líquido e/ou vibrações de grande frequência transmitidas pela água ou ar. Estes receptores estão presentes na cabeça e seus apêndices, tórax, asas, patas e abdómen [99, 101].

- **Recetores de temperatura e humidade:** os diferentes insetos apresentam preferências térmicas e hídricas, o que explica a sua localização em locais definidos [102], já que a temperatura e a humidade são condições que influenciam a seleção da planta hospedeira e a orientação dos insetos, além de, condicionarem os seus processos metabólicos e estado fisiológico [103]. Alguns insetos possuem mecanismos de aclimatização, ajustando com o tempo as suas respostas à temperatura e humidade relativa. Os recetores especializados na percepção destes estímulos não são bem conhecidos, no entanto, as antenas parecem apresentar estes recetores em número não muito elevado [99, 102].

A resposta fisiológica dos adultos de *C. capitata* varia consoante a temperatura. Com idades superiores a 14 dias são mais tolerantes a variações de temperatura (máximas ou mínimas), sendo as moscas com 28 dias as mais tolerantes, podendo suportar temperaturas mínimas de 5-6 °C e temperaturas máximas de 42-43°C. A temperatura mais adequada para *C. capitata* é 25 °C e a percentagem de humidade relativa é de 65 % [103].

- **Fotorrecetores:** órgãos que respondem aos estímulos visuais como a capacidade de percepção de imagens, cores, alterações na intensidade luminosa e sentido de orientação visual. Os recetores estão localizados principalmente nos ocelos laterais e dorsais, assim como nos olhos compostos dos adultos [99]. O espectro de energia eletromagnética perceptível pelos insetos ocorre tanto abaixo dos 300 nm (ultravioleta) como acima dos 750 nm, onde a energia é bastante reduzida mas suficiente para originar uma resposta [104]. *C. capitata* apresenta dois picos de sensibilidade, um aos 356 nm (zona ultravioleta) e outro aos 485-500 nm (zona de verde-amarelo), sendo este espectro que lhe permite diferenciar árvores do restante meio ambiente [104, 105]. Tal como muitos outros insetos fitófagos *C. capitata* é bastante atraída pela cor amarela [60, 106 – 108].
- **Quimiorrecetores:** órgãos que respondem aos estímulos químicos como, o gosto e o cheiro. Os quimiorrecetores do gosto permitem a percepção de substâncias no estado líquido, enquanto que, os quimiorrecetores de olfato permitem a percepção de compostos químicos no estado gasoso. A fonte de emissão das moléculas de gases pode encontrar-se longe do animal (recetor) e a sua concentração no ar ser extremamente baixa. A distinção entre gosto e olfato não é absoluta. As sensilas de gosto dos insetos podem responder também aos odores já que há por exemplo proteínas recetoras do gosto nas antenas dos insetos as quais apresentam funções olfactivas [99, 109].

2.1.2.2 Sistema Olfativo: Estrutura, Recepção e Resposta

2.1.2.2.1 Estrutura Anatômica

A percepção do odor é mediada por órgãos olfativos especializados (sensilas) localizados principalmente nas antenas e/ou em palpos da armadura bucal [110, 111]. Nos dípteros, as antenas estão inseridas na parte mediano-anterior da cabeça, podem ser compridas e formadas por vários artículos, mais ou menos semelhantes, ou podem ser muito curtas e constituídas por um, dois ou três artículos, no último dos quais se insere, terminal ou lateralmente, uma arista [24].

As antenas de *C. capitata* encontram-se inseridas muito próximas uma da outra. São formadas por três artículos, dos quais o primeiro artículo, o escapo, é curto e subcilíndrico, e tem uma coloração castanho-escuro; o segundo artículo é ligeiramente recurvado para fora, mais comprido e com coloração castanho-claro. O terceiro chamado flagelo ou funículo tem um comprimento mais alongado e apresenta uma cor que varia entre creme a amarelado [24].

As sensilas olfativas correspondem a uma adaptação especializada para a recepção e transmissão de estímulos químicos às dendrites dos neurónios presentes no seu interior, as quais reagem dando origem a impulsos nervosos que se convertem em sensação de olfato. Existem vários tipos de sensilas classificadas de acordo com a sua estrutura [109].

Mayo [112] estudou o número, distribuição e morfologia das sensilas no terceiro artículo da antena dos adultos de *C. capitata*, já que é neste artículo onde se encontram a maioria dos órgãos sensoriais (sensilas) das antenas. Este autor encontrou quatro tipos de sensilas, todas com função olfativa: as *sensilas tricónicas*: longas, com forma de pêlos com paredes espessas com poros; as *sensilas basicónicas*: curtas, forma de pêlos com paredes finas com poros; as *sensilas coelóconicas*: encontradas em forma de estaca, com parede espessa, simples e com poros e as *sensilas placónicas*: em forma de placas, [95, 110, 112]. Posteriormente, Dickens [95] mostrou que tanto os machos como as fêmeas destas espécies apresentavam o mesmo número e forma de segmentos na antena [95]. O número de recetores olfativos é muito variável entre espécies. Por vezes, na mesma espécie os órgãos olfativos variam consoante as fases do seu ciclo de vida. Geralmente as larvas apresentam apenas um pequeno número de células olfativas enquanto que, nos adultos esse número é bem maior [109]. No entanto, em alguns adultos existem diferenças entre os sexos, nomeadamente em relação aos quimiorrecetores, sendo que os machos apresentam menor número destes recetores do que as fêmeas. Contudo este fato parece não explicar as diferentes respostas dos dois sexos em relação aos odores atrativos, feromonas ou odores do hospedeiro [109].

No ambiente natural os sinais de odor são sempre misturas de compostos químicos e o sistema olfativo tem de descodificar a informação sobre a qualidade, quantidade (concentração/razão) e

distribuição espacial [109]. O sistema olfativo não é capaz de captar todos os estímulos voláteis presentes no exterior e por isso funciona como um filtro. Os neurónios são sensíveis apenas a uma limitada gama de produtos químicos voláteis que ocorrem no ambiente, por esta razão, os recetores olfativos podem dividir-se em duas categorias, os especialistas e os generalistas. Os recetores olfativos na categoria de especialista (ex. feromona sexual) respondem apenas a um número pequeno de compostos estruturalmente relacionados enquanto que os generalistas respondem a uma grande variedade de compostos estruturalmente não relacionados [109, 113]

As espécies de insetos oligófagas e polífagas apresentam recetores olfativos com elevada sensibilidade e seletividade para produtos químicos que são comuns a muitas espécies de plantas bem como para produtos químicos mais característicos de determinados grupos de plantas [109].

2.1.2.2.2 Receção e Tradução de Sinais Olfativos

A tradução do sinal é o processo pelo qual um estímulo químico recebido por um recetor é convertido em potencial de acção. Este processo envolve uma sequência de etapas [109]. As moléculas de odor (estímulo químico) hidrofóbicas difundem-se através dos poros presentes nas paredes das sensilas, ligando-se posteriormente a proteínas recetoras do odor (OBPs) hidrofílicas (solúveis em água). As OBPs transportam as moléculas de odor até aos recetores olfativos (ORs), moléculas presentes na membrana dendrítica. Então as moléculas de odor ou o complexo molécula de odor e OBPs ligam-se a estes recetores. Os ORs nos insetos são proteínas G acopladas (GPC), sete proteínas transmembranares que actuam através da ativação de segundos mensageiros tais como o monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) ou inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) envolvidos na abertura dos canais iónicos na membrana dendrítica. A abertura dos canais iónicos leva à despolarização da membrana dendrítica, isto resulta em potenciais de ação que viajam sobre a membrana axonal até aos glomérulos no lobo antenal do sistema nervoso central (SNC), resultando em uma resposta por parte do inseto [109].

A atividade das moléculas de odor termina normalmente pela ação de enzimas presentes na linfa das sensilas que as degradam ou pela ação de enzimas de inativação tais como a glutathione-S-transferase (GST) presentes no citoplasma das células de apoio que circundam o corpo da célula nervosa [109].

2.1.2.2.3 Compostos Voláteis que Estimulam a Resposta de *C. capitata*

Um largo espetro de compostos voláteis é detetado por ambos os sexos de *C. capitata*, daí a sua elevada importância (Tabela 2-4). Embora ainda pouco se saiba sobre o funcionamento da receção neurofisiológica em *C. capitata* têm sido obtidos resultados interessantes sobre o efeito de alguns

compostos voláteis de extratos ou de óleos essenciais de frutos ou tecidos de plantas no comportamento destes insetos [62, 97, 98, 114].

- **Acasalamento**

A exposição a certas plantas ou a compostos voláteis libertados por algumas plantas podem influenciar o sucesso do acasalamento dos machos [115]. Os machos quando são expostos ao óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) [96, 116], ao óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis* Osbeck) [97] e/ou a outros óleos essenciais de várias espécies de *Citrus* [117, 118, 119] aumentam significativamente o número de acasalamentos dos machos quando comparados com indivíduos não expostos a estes compostos. De acordo com Shelly [117, 120], o sucesso no acasalamento deve-se ao composto α -copaeno, encontrado em quantidades relativamente elevadas em muitos óleos essenciais de plantas hospedeiras. Também segundo este autor, os machos são altamente atraídos pelo composto metil eugenol, que é encontrado em mais de 30 famílias de plantas. Segundo Shelly [117] os machos que se alimentam de plantas que obtêm na sua composição o metil eugenol produzem um feromona sexual mais atraente ganhando mais vantagem no acasalamento relativamente aos outros machos.

- **Oviposição**

Os frutos e partes vegetativas das plantas apresentam diferentes composições voláteis que muitas vezes influenciam a escolha da planta que a fêmea faz para a oviposição [114]. Segundo Light [62] a magnitude da resposta de uma antena dos adultos de *C. capitata* aos voláteis de netarinas esta relacionado com o grupo funcional, comprimento de cadeia e insaturação do composto. O grau de potência/atração dos compostos estão por ordem decrescente representados da forma seguinte: aldeídos e álcoois insaturados com seis carbonos, metil e etil hexanoatos e octanoates, hexenil acetatos e monoterpenos, acetatos e álcoois de cadeia mais curtos e por último as lactonas.

Os aldeídos, álcoois e acetatos insaturados geralmente eliciam maiores respostas do que os seus análogos saturados, sendo as configurações isoméricas (E)-2-isómeros mais atrativas [62]. Estes compostos são no geral constituintes do odor das folhas e dos frutos verdes libertados pela maioria das plantas [62, 121, 122] que, segundo Light [121] fornecem às fêmeas uma ideia sobre os locais adequados para o desenvolvimento larvar e ajudam-na na toma de decisões quanto aos melhores sítios de desova.

Tabela 2:Resumo dos compostos voláteis que estimulam uma resposta em *Ceratitis capitata* indicando as características dos insetos e a localização dos compostos obtido a partir de dados publicados em bioensaios com condições das moscas: (CL) Criadas em Laboratório; (S) Selvagens; Resposta dos insetos: (-) Menor Resposta, (+) Resposta intermédia; (+++) Maior Resposta e (*)Compostos presentes no odor libertado pelos machos; Localização do volátil (fruto ou planta).

Compostos	Condições Insetos					Resposta		Localização		Ref. Bib.	
	Nome	CL	S	Sep. p/sexo	Idade (dias)		♂	♀	Fruto		Planta
					< 5	> 5					
Acetonas											
Pentan-2-ona*	x		x	x		+++	+++		x	[123]	
2-Cicloheptanona	x				x		+		x	[124]	
2-Heptanona	x				x		+++		x	[125]	
3-Metil-5-Heptanona		x				-	+	x		[126]	
2-Hexanona		x			x	+	+	x		[126]	
2-Octanona		x				-	-	x		[126]	
2-nonanona	x				x		+	x		[124]	
Álcoois											
Etanol*	x		x	x		+++	+++	x		[94, 121, 123]	
2-Propanol	x		x	x		+++	+++	x		[121]	
2-Metil-1-propanol*	x		x	x		+++	+++	x		[121, 123]	
3-Metil-2-buten-1-ol		x				-	-	x		[126]	
3-Metil-1-butanol		x				-	-	x		[124, 125]	
2-Pentanol*	x		x	x		-	-		x	[123]	
3-Pentanol	x		x	x		-	+	x		[121]	
(Z)-2-Pentenol	x				x		+	x		[124, 125]	
Hexan-1-ol	x		x	x		+++	+++	x		[94, 121]	
(Z) ou (E)-2-Hexen-1-ol	x		x	x		+	+	x		[94, 121, 125]	
(Z) ou (E)-3-Hexen-1-ol	x		x	x		+	-	x		[94, 121]	
Álcool Feniletílico	x				x		+	x		[124, 126]	
Álcool Benzílico		x						x		[126]	
Aldeídos											
3-metil 1-butanal		x			x	-	-	x		[125]	
3-Metil-1-butanal benzeno	x				x		+	x		[126]	
Hexanal	x		x	x		+++	+++	x		[94, 121]	
(E)-2-Hexenal	x		x	x		-	-	x		[94, 121]	
Benzaldeído*	x		x	x		+++	+++	x		[94, 121, 123]	
Heptanal*	x		x	x		+	+		x	[94, 123]	
Octanal*	x		x	x		+	++		x	[94, 123]	
Nonanal*	x		x	x		+	+		x	[94, 123]	
Dodecanal	x		x	x		-	-		x	[94, 125]	

Tabela 3 (continuação):Resumo dos compostos voláteis que estimulam uma resposta em *Ceratitis capitata* indicando as características dos insetos e a localização dos compostos obtido a partir de dados publicados em bioensaios com condições das moscas: (CL) Criadas em Laboratório; (S) Selvagens; Resposta dos insetos: (-) Menor Resposta, (+) Resposta intermédia; (+++) Maior Resposta e (*)Compostos presentes no odor libertado pelos machos; Localização do volátil (fruto ou planta).

Compostos Nome	Condições Insetos				Resposta		Localização		Ref. Bib.	
	CL	S	Sep. p/sexo	Idade (dias)		♂	♀	Fruto		Planta
				< 5	> 5					
Ésteres										
Acetato de etilo*	x		x	x		+++	+++	x		[94, 121, 123]
Acetato de Metilo*	x		x	x		+++	+++	x		[121, 123]
Acetato de Propilo*	x		x	x		+++	+++	x		[94, 121, 123]
Propanoato de Etilo*	x		x	x		+	+	x		[123]
Acetato Butilo*	x		x	x		-	+	x		[94, 121, 123]
Butanoato de etilo	x		x	x		+	-		x	[123]
Etil but-2-enoato*	x		x	x		-	-		x	[123]
Acetato de 3-metilbutil*	x		x	x		-	-	x		[121, 123]
Acetato de 2-fenil-etil*	x		x	x		+	+		x	[123]
Acetato Hexilo*	x		x	x		+	+	x		[94, 121, 123]
Acetato de (E)-2-Hexenil	x		x	x		-	-	x		[94, 121]
Acetato de (Z)-3-Hexenil	x		x	x		+	+	x		[121]
Acetato Heptilo*	x		x	x		+	+		x	[94, 123]
Acetato Octilo	x		x	x		+	+	x		[94, 121]
(Z) ou (E)-3-Octanoato de etilo*	x		x	x		-	-		x	[123]
(E)-3-Octanoato de metilo*	x		x	x		+	+			[123]
(E)-3-Hexanoato de etilo*	x		x	x		-	-			[123]
(E)-2-Hexanoato de metilo*	x		x	x		-	-			[123]
(E)-2-Hexanoato de etilo*	x		x	x		-	-			[123]
(E)-3-Decanoato de Etilo*	x		x	x		-	+			[123]
Acetato de Geraniil*	x		x	x		+	-			[123]
Acetato Isoamilo		x				+	+	x		[126]
Propanoato de Geraniil*	x		x	x		+	+			[123]
Butanoato de Etilo*	x		x	x		+	-	x		[121, 123]
Hexanoato de Etilo*	x		x	x		-	-	x		[121, 123]
6-Metil hept-5-en-2-ona*	x		x	x		-	-			[123]
Heptanoato de Metilo	x		x	x		-	-	x		[121]
Éteres										
Metil Eugenol		x	x			+++		x	x	[127]

Tabela 4 (continuação):Resumo dos compostos voláteis que estimulam uma resposta em *Ceratitis capitata* indicando as características dos insetos e a localização dos compostos obtido a partir de dados publicados em bioensaios com condições das moscas: (CL) Criadas em Laboratório; (S) Selvagens; Resposta dos insetos: (-) Menor Resposta, (+) Resposta intermédia; (+++) Maior Resposta e (*)Compostos presentes no odor libertado pelos machos; Localização do volátil (fruto ou planta).

Compostos	Condições Insetos					Resposta		Localização		Ref. Bib.	
	Nome	CL	S	Sep. p/sexo	Idade (dias)		♂	♀	Fruto		Planta
					< 5	> 5					
Monoterpenos											
Canfeno		x					-	-	x		[126]
3-Careno	x					x	+	+	x		[128]
Carvacrol		x					+	+	x		[126]
1,8-cineol							-	-	x		[126]
p-cimeno*	x		x	x			+	+	x		[121, 123, 126]
Dihidromirceno		x					-	-	x		[126]
α ou β -felandreno	x		x	x			-	+	x		[121, 126]
Isotimol		x					-	-	x		[126]
Limoneno*	x		x	x			-	+	x		[121, 123, 129]
Oxido limoneno		x					-	-	x		[126, 129]
Linalol*	x		x	x			+++	+++	x		[121, 123]
Mirceno*	x		x	x			+	+	x		[121, 123]
Mentol		x					+	+	x		[126]
Mirtenol		x					-	-	x		[126]
(E) ou (Z)- β -Ocimeno*	x		x	x			-	+	x		[121, 123]
α -pineno	x		x	x			+++	+++	x		[121]
Terpinoleno*	x		x	x			+	+	x		[123]
γ -terpineno*	x		x	x			+	+	x		[121, 123]
α -terpineno			x				-	-	x		[126]
α -terpinol		x					-	-	x		[126]
Timol		x					-	-	x		[126]
Sesquiterpenos											
Aromadrendreno		x			x		+	+	x		[126]
β -Cariofileno	x				x		-	-	x		[128, 130]
α -copaeno	x		x	x	x		+++	+	x		[131]
α e β -farnesene*	x		x	x			+++	+++			[123]
α -humuleno		x					-	-	x		[126, 130]

2.1.2.2.4 Fatores que Afetam a Respostas de *C. capitata*

Os adultos no geral podem distinguir e localizar os voláteis libertados pelas plantas hospedeiras. No entanto, a distância a partir da qual os adultos conseguem detetar o odor proveniente da planta hospedeira ainda é desconhecida [114]. A resposta dos insetos aos voláteis libertados pelas plantas pode variar dependendo da sua idade e condição fisiológica, já que com a idade os órgãos sensoriais podem diminuir a capacidade de resposta a esses estímulos [100, 114, 132].

As alterações fisiológicas que ocorrem durante a maturação reprodutiva e o acasalamento, também podem influenciar o sistema olfativo dos insetos. Um exemplo disso, é o comportamento adoptado pelas fêmeas, que quando virgens preferem o odor da feromona masculina em vez do odor dos frutos hospedeiros, no entanto, após o acasalamento elas trocam de preferência, optando pelo odor emitido pelos frutos [114, 132, 133]. Os estímulos olfativos libertados pelas plantas hospedeiras também podem influenciar a maturação dos ovários e o desenvolvimento dos ovos nos mesmos [134].

2.1.2.2.5 Métodos para Avaliar a Resposta dos Insetos aos Compostos voláteis

Têm sido utilizados vários métodos para avaliar nos insetos a atividade atrativa e/ou repelente de diferentes fontes de odores [135]. Os métodos mais comuns utilizam o olfatómetro, o túnel de vento e o eletroantenograma (EAGs).

2.1.2.2.5.1 Olfatómetro

O olfatómetro é um instrumento desenvolvido para análise qualitativa e quantitativa da resposta dos insetos aos odores e têm vindo a ser muito utilizado para avaliar a utilidade de alguns compostos químicos ou produtos naturais como potenciais ferramentas no controlo e monitoramento de pragas. Igualmente tem sido utilizado no isolamento, identificação e síntese de feromonas sexuais ou odores hospedeiros [136, 137]. O olfatómetro consiste basicamente num tubo onde os insetos são expostos a uma corrente de ar com um odor determinado. A resposta comportamental dos insetos pode ser estudada e medida de várias formas dependendo do desenho do olfatómetro e do tipo de bioensaio [137]. Existem olfatómetros de vários tipos que podem variar no número de braços entre eles os que têm dois, quatro [138, 139] ou seis braços [137, 140] mas também na forma de H [141], em forma de T [142] ou em forma de Y [143-146]. Os olfatómetros em forma de Y têm vindo a ser recentemente os mais utilizados em testes com artrópodes de diferentes ordens como Coleoptera [147, 148], Díptera [137, 149, 150] e em Lepidóptera [151].

O olfatómetro em forma de Y consiste em um braço principal (tronco) e dois mais pequenos. Num dos pequenos é colocada a amostra e o outro actua como controle. Os insetos são colocados no tubo principal, depois é ligado o fluxo de ar que arrasta os voláteis da amostra até aos insetos. No final do teste, o número de insetos que se dirigem a cada um dos braços do olfatómetro é anotado para avaliar se houve ou não atração [135]. De acordo com Geier [143] o olfatómetro em forma de Y apresenta as vantagens seguintes:

- Os testes são simples e rápidos;
- A comparação de extratos de odores de fontes naturais ou de atrativos sintéticos é fácil;
- Permite a monitorização de todas as sequências de comportamento na localização do hospedeiro como, a percepção, orientação até à fonte de odor e chegada;
- Permite o fácil controle e prevenção de contaminação causada por estímulos anteriores;
- O equipamento é fácil de construir e pode ser facilmente adaptável a várias espécies de insetos [152].

A concepção de um bioensaio a fim de testar o comportamento dos insetos a odores de plantas ou dos seus componentes utilizando um olfatómetro em forma de Y, envolve a consideração de diversos estímulos que podem influenciar a locomoção do inseto, como a intensidade e distribuição da luz, a humidade e o fluxo de ar, a cor da superfície na qual se apoia o olfatómetro e a posição do olfatómetro (horizontal ou vertical) [144, 152].

Cada espécie de insetos difere na sua capacidade de resposta a estímulos diferentes e por isso, cada espécie necessita de adaptações especiais no olfatómetro e a area envolvente [152]. A optimização de um bioensaio envolve também a valorização do estado motivacional dos insetos, ou seja, insetos privados de alimentos têm maior probabilidade de responder a odores de alimentos, e repondem de forma diferente dos insetos acabados de se alimentar [152]. O mecanismo de orientação do inseto envolve a distinção e preferência pelo braço com o odor ou pelo braço sem odor, embora não se possa esquecer da comparação temporal das intensidades de estímulo [152, 153].

O olfatómetro em forma de Y foi utilizado com adultos de *C. capitata* para testar a atração de machos por fêmeas [154] e para testar a atividade olfativa de quatro espécies do género *Tagetes* (Asteraceae, Helenieae) [23].

2.1.2.2.5.2 Túnel de Vento

Os túneis de vento constituem um método frequentemente utilizado no isolamento e identificação de feromonas, desenho de armadilhas, estudos de comportamento como a qualidade, habituação,

adaptação sensorial, movimento e orientação dos insetos e, mais recentemente, para detecção de efeitos comportamentais de intoxicação por insecticida [155] e estudos de resposta aos compostos voláteis de plantas [156, 157].

O princípio deste teste é idêntico ao anterior. Os túneis de vento consistem em câmaras com temperaturas, percentagem de humidade, luminosidade e fluxo de ar controlados. Neste teste os insetos respondem a uma fonte de odor distante. O fluxo de ar dispersa os voláteis da amostra através da atmosfera dentro de uma câmara (cilíndrica ou rectangular) e os insetos são guiados pelo odor e voam livremente, dentro dessa mesma câmara, até à fonte de estímulo [158].

Este método apresenta diversas vantagens entre elas [155]:

- Permite que o inseto se movimente livremente;
- Possibilita a monitorização de todas as sequências de comportamento na localização da fonte do odor como, a percepção, a orientação e a chegada até à fonte de odor;
- Os testes podem ser repetidos várias vezes nas mesmas condições;

Esta teste foi utilizado em *C. capitata* para estudar a resposta das fêmeas aos componentes maioritários presentes no odor dos machos [159], a resposta de machos ao feromona sexual [160] e a resposta aos componentes voláteis de plantas hospedeiras [156].

2.1.2.2.5.3 Eletroantenograma

A técnica de eletroantenograma (EAG) tem sido utilizado em estudos de identificação de feromonas, e, mais recentemente, na identificação de voláteis de plantas que afectam o comportamento dos insetos [161]. Esta técnica mede as respostas eletrofisiológicas produzidas pela recepção de odores ao nível periférico. As respostas obtidas no EAG representam a soma dos potenciais de resposta dos milhares e diferentes neurónios recetores olfativos presentes na antena de um inseto [162]. Esta técnica utiliza eléctrodos (ex. platina, prata, outro) ligados nas extremidades da antena de um inseto e o contato elétrico é mantido através de uma solução salina ou gel condutor. Quando a molécula de odor estimula o sistema olfativo do inseto é gerada pela antena uma amplitude de tensão que aumenta com o aumento da concentração desse odor, até que seja atingido um nível de saturação [161].

O eletroantenograma pode operar com substâncias químicas puras ou com misturas complexas quando acoplado a um cromatografo gasoso (GC). Desta forma podem ser avaliados substratos obtidos de insetos ou plantas sem fraccionamento da amostra [161]. No entanto, esta técnica apresenta duas desvantagens. Primeiro a atividade registada pelo EAG pode não indicar a atividade comportamental do inseto e, por isso, o papel biológico dos compostos ativos obtidos por EAG devem ser posteriormente

determinados em bioensaios comportamentais. As respostas dos insetos aos voláteis de plantas obtidos a través dos EAG não é específico da espécie e ainda não está claro se há correlação entre os espectros de resposta de EAG dos insetos aos voláteis da planta ou voláteis relacionados ao hospedeiro [163].

Esta técnica foi utilizada em *C. capitata* para estudar a resposta aos compostos voláteis de plantas [121, 129] e a resposta a feromonas sexuais [123, 130, 164].

2.2 Compostos Voláteis das Plantas: Composição, Biossíntese, Função, Emissão e Extração

2.2.1 Composição e Biossíntese dos Compostos Voláteis

2.2.1.1 Composição

Para compensar a imobilidade, as plantas têm de se ajustar ao ambiente circundante durante o seu ciclo de vida e, por isso, desenvolveram mecanismos diferentes para a sua interação com o meio ambiente, incluindo a libertação de compostos voláteis das folhas, flores e frutos para a atmosfera e, raízes no solo [165, 166]. Cada planta pode ser capaz de emitir mais de uma centena de compostos voláteis que variam na sua estrutura e nos seus grupos funcionais [167]. Actualmente são conhecidos cerca de 1700 compostos voláteis isolados de mais de 90 famílias de plantas, estes voláteis constituem cerca de 1 % dos metabólitos secundários das plantas [168, 169, 165].

Quimicamente os compostos voláteis das plantas são hidrocarbonetos com baixo peso molecular (abaixo dos 300 Da) [170, 171] e elevada pressão de vapor que facilmente se volatilizam quando expostos ao ar [165, 172], sendo a sua volatilidade maior quanto menor for o seu peso molecular [173]. Os compostos voláteis podem ser divididos em quatro famílias químicas principais de acordo com a sua estrutura e biossíntese [170, 171, 174] terpenos, compostos benzénicos, derivados de ácidos gordos e derivados de aminoácidos.

- **Terpenos**

Os terpenos representam uma das maiores famílias químicas de compostos das plantas. Eles podem ser classificados de acordo com o número de átomos de carbono. Os compostos voláteis que pertencem a este grupo são maioritariamente monoterpenos (C₁₀) e sesquiterpenos (C₁₅) [175]. Os monoterpenos, são responsáveis pelos odores florais característicos de muitas espécies de plantas [176] e muitos outros são os principais componentes dos óleos essenciais da planta [177]. Podem ser acíclicos ex. geraniol, monocíclicos ex. limoneno ou bicíclicos ex. pineno [175]. Muitos sesquiterpenos também são encontrados em óleos essenciais como o β-cariofileno e o α-humuleno [178].

- **Compostos Benzénicos**

As plantas contêm uma grande variedade de derivados benzénicos (ex. tolueno) apresentam um como estrutura básica um anel aromático e outros constituinte [168, 175].

- **Derivados de ácidos gordos**

Os compostos derivados de ácidos gordos conhecidos por *compostos de folha verde* conferem às folhas danificadas um odor característico [173]. Esses compostos são maioritariamente álcoois e aldeídos com seis átomos de carbono (ex. 3 cis ou trans-hexenol, hexenol, n-hexanal), formados pela degradação oxidativa dos ácidos gordos polinsaturados linoleico e linolenico [173]. Também são encontrados algumas acetonas (ex. butanona) e ésteres (acetato de cis-hexenil). A quantidade relativa destes voláteis é característica de cada espécie de planta [175].

- **Derivados de aminoácidos**

Os derivados de aminoácidos podem ser aldeídos, álcoois, ésteres, ácidos e compostos voláteis contendo azoto ou enxofre [173].

2.2.1.2 Biossíntese

As plantas tal como todos os outros organismos vivos apresentam um conjunto de reações bioquímicas que mantêm o seu metabolismo (primário e secundário) [168]. O metabolismo primário corresponde ao conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial para a sobrevivência como, por exemplo, a fotossíntese e a produção de lípidos e de hidratos de carbono. Com base no metabolismo primário, as plantas desenvolveram o metabolismo secundário através do qual produzem uma grande variedade de substâncias vegetais secundárias que desempenham funções de defesa e proteção da planta. No entanto, a composição e concentração destas substâncias vegetais secundárias variam de planta para planta da mesma espécie e/ ou diferentes espécies [168]. Entre as substâncias vegetais secundárias encontram-se os compostos voláteis.

A biossíntese de compostos voláteis pode ocorrer em diferentes tecidos das plantas [170, 179 – 182]. Os compostos voláteis são sintetizados a partir de precursores universais, no entanto, no passo final da sua formação podem sofrer várias modificações enzimáticas como hidroxilação, acetilação e metilação levando a originar uma grande diversidade dos compostos voláteis [165]. Assim, cada via/rota bioquímica é responsável por um conjunto de compostos voláteis [183].

A glucose é precursor do piruvato e ácido chiquimico nos plastídios (Figura 2). O piruvato é precursor dos derivados de aminoácidos, da acetil coenzima-A e do metil-eritriol-fosfato (MEP). Os terpenos são produzidos pela formação e condensação de unidades básicas C₅, que ocorre da produção de difosfato de isopentenilo (ou difosfato) (IPP), e do seu isómero difosfato de dimetilalilo (DMAPP), e a subsequente condensação de IPP e DMAPP por duas vias diferentes, via do mevalonato (MAP) no citosol ou via metil-eritriol-fosfato (MEP) nos plastídios, todos os passos envolvidos na formação de terpenos são mediados por enzimas terpeno sintetases (TPSS), a variedade de terpenos é formada por diferentes

oxidações, isomerizações e conjugações. Também pela via do mevalonato (MAP) formam-se os derivados de ácidos gordos que apresentam como precursores ácidos gordos insaturados C₁₈ como o ácido linoleico e ácido linolénico e são desoxigenados por lipoxigenases (LOX) e posteriormente metabolizados por uma matriz de enzimas incluindo óxido de aleno sintetase (AOS) ou a hidroperóxido liase (HPL). No ramo AOS, uma série de reações enzimáticas conduz à formação do ácido jasmónico (JA) que pode ser convertido no éster metil jasmonato (MeJA), no ramo, a clivagem dos hidroperóxido dos ácidos gordos mediada por HPL resulta na formação de compostos voláteis de cadeia curta C₆ ou C₉, conhecidos pelos voláteis da folha verde. Os fenilpropanóides são produzidos via do ácido chiquimico no citosol e apresentam como precursores os aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e/ou tirosina). Os compostos benzénicos provêm do ácido cinâmico, um ramo lateral da via dos fenilpropanóides. Os derivados de aminoácidos alifáticos (ex. compostos voláteis com azoto ou enxofre) podem ser produzidos via piruvato ou pela via do ácido chiquimato [174, 184].

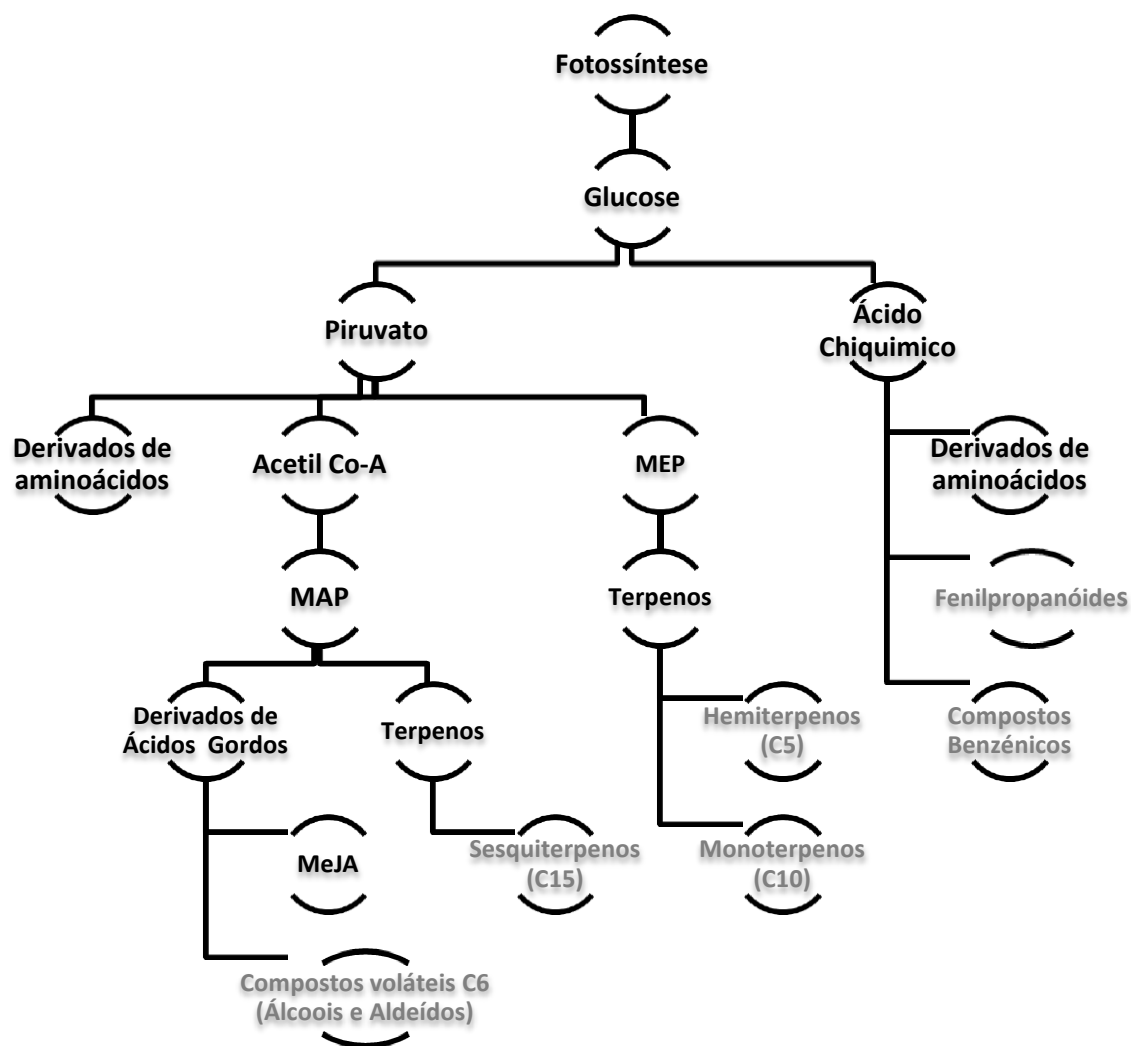


Figura 2:Resumo das vias biossintéticas envolvidas na biossíntese de compostos voláteis dentro das plantas.

2.2.1.3 Variação no Tipo de Compostos Consoante o Órgão da Planta

A composição qualitativa e quantitativa dos compostos voláteis pode diferir não só entre espécies como também dentro da mesma espécie ou ainda entre os diferentes órgãos de uma mesma planta [168, 175]. Normalmente, os compostos com função protectora estão presentes nos órgãos da planta onde os danos causados pelos insetos podem provocar maiores perdas no seu *fitness* ou são produzidos logo após ataque inicial de herbívoros de forma a reduzir os custos de energia gastos na sua biossíntese. Muitos destes compostos podem ser tóxicos para a própria planta e neste caso precisam de ser armazenados em estruturas adequadas o que envolve custos energéticos adicionais [185].

Também dentro do mesmo órgão pode haver variações quanto a composição química dos vários compostos. Geralmente, para facilitar uma maior proteção, as folhas novas da planta e/ou outras partes em crescimento têm mais compostos do que os tecidos maduros [186]. A composição volátil pode ainda variar dentro de uma única folha, sendo que em algumas a composição volátil pode aumentar a partir da base até o ápice [175].

2.2.2 Funções dos Compostos Voláteis

Os compostos voláteis aparentemente são produzidos como parte de uma estratégia de defesa da planta atuando contra diversos tipos de stress biótico e abiótico [165, 170, 171, 187, 188]. Um mesmo composto pode ainda ter diversas funções [189].

2.2.2.1 Defesa Contra o Stress Abiótico

Alguns compostos voláteis são capazes de proteger as plantas contra os danos ambientais como, por exemplo, os causados pelo calor, permitindo-lhes manterem uma taxa de fotossíntese e termotolerância da planta [190, 191]. Também podem servir como antioxidantes protegendo as plantas contra diversas “agressões” externas, incluindo o stresse oxidativo [192].

2.2.2.2 Defesa Contra o Stress Biótico

Alguns dos compostos voláteis emitidos pelas plantas facilitam a reprodução porque permitem atrair polinizadores e disseminadores de sementes [165, 193, 194], mas também podem servir para defender as plantas contra os fungos e as bactérias [195, 196], repelir [197, 198] ou intoxicar herbívoros e microorganismos [199] ou atrair predadores naturais dos herbívoros que atacam as plantas [200 - 202]. A libertação destes compostos pela planta pode reduzir não só o número de herbívoros que a atacam [198] como também podem servir de sinais de comunicação com as plantas vizinhas avisando-as dos ataques dos que estão a ser alvo [203]. Estes sinais induzem a expressão de genes de defesa ou a emissão de

voláteis nas plantas vizinhas [204, 205] ou ainda podem ajudar a que as plantas vizinhas possam responder mais rápido ao mesmo ataque [206]. Os voláteis emitidos a partir de raízes também podem contribuir para estabelecer um sistema de defesa abaixo do solo, agindo como substâncias antimicrobianas ou substâncias anti herbívoros ou ainda para atrair inimigos dos herbívoros que se alimentam das raízes [207].

2.2.2.2.1. Efeitos Repelentes em Insetos

Muitos dos compostos voláteis produzidos pelas plantas apresentam uma função repelente aos insetos. Os compostos voláteis repelentes atuam localmente ou a determinada distância, impedindo um inseto de passar ou voar para essa superfície [136, 208]. Podem ser usados pelo homem para repelir os insetos (ex. mosquitos, piolhos) da área onde foram aplicados, de forma a proteger um indivíduo das suas picadas, ou para evitar tanto as pragas das culturas no campo como aquelas dos produtos armazenados [209].

Ao longo dos últimos 50 anos, muitas plantas já foram examinadas como potenciais fontes de compostos repelentes contra diferentes espécies da ordem Díptera (Tabela 5) [136, 210 - 212]. A maioria dos estudos têm tentado encontrar repelentes especialmente para espécies de insetos de interesse médico como mosquitos dos géneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* [136]. As espécies de plantas mais conhecidas e utilizadas por terem substâncias repelentes destas espécies de insetos são principalmente a árvore de neem, *Azadirachta indica* [213 - 215], gramíneas do género *Cymbopogon* [216 - 219] varias espécies de eucalipto, *Eucalyptus* [213, 220] e de alfavaca, *Ocimum* [210, 221]. Muitos compostos destas plantas já estão a ser utilizados sendo a base da formulação comercial de muitos repelentes [222].

O conhecimento do modo de acção dos repelentes, obtidos na forma de óleo ou de extratos [136], é importante porque poderão servir de orientação para o desenvolvimento de novos produtos [209].

O efeito de um repelente pode ser o resultado de um grande número de eventos fisiológicos e bioquímicos. Embora o seu mecanismo de acção ainda não seja claro, o efeito repelente parece envolver o reconhecimento do estímulo através de recetores olfativos específicos (ORNs) presentes em alguns insetos sendo que a resposta ao composto repelente resulta na inibição de um determinado comportamento do inseto. A capacidade de reconhecimento pelos ORNs parece estar relacionada com as características do composto repelente (ex. volatilidade e estrutura), no entanto, alguns insetos tem padrões de sensibilidade semelhantes a produtos químicos não relacionados. Outros insetos podem diferir em sensibilidade a compostos de estruturas semelhantes [209].

O uso de substâncias naturais com atividade repelente no controlo de pragas é um dos métodos mais antigos utilizados tendo sido usado pelos egípcios e romanos. Contudo, devido à elevada volatilidade dos repelentes naturais, os compostos químicos tendem a ter uma eficácia de curta duração

e, por esta razão, tornou-se necessário a produção de repelentes sintéticos com maior duração [223, 224].

Tabela 5: Alguns dos compostos voláteis de plantas mais conhecidos por terem efeitos repelentes contra espécies da ordem Díptera segundo os dados publicados.

Composto	Formúla Química	Família Química	Plantas de onde pode ser extraído	Referência
Careno	C ₁₆ H ₁₆	Monoterpeno	<i>Ocimum fischeri</i> (Labiatae); <i>Endostemon tereticaulis</i> (Labiatae)	[225]
Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	Monoterpeno	<i>Thymus vulgaris</i> (Lamiaceae)	[226 – 228]
Cânfora	C ₁₀ H ₁₆ O	Acetona	<i>Ocimum suave</i> (Lamiaceae); <i>Ocimum basilicum</i> (Lamiaceae)	[229]
Citronelol	C ₁₀ H ₂₀ O	Monoterpeno	<i>Cymbopogon</i> spp. (Poaceae); <i>Corymbia citriodora</i> (Myrtaceae)	[135, 227, 230]
Citronelal	C ₁₀ H ₁₈ O	Monoterpeno	<i>Cymbopogon</i> spp. (Poaceae); <i>Corymbia citriodora</i> (Myrtaceae)	[135, 227, 230]
p-Cimeno	C ₁₀ H ₁₄	Monoterpeno	<i>Thymus vulgaris</i> (Lamiaceae)	[226 – 228]
Trans-Cinamaldeído	C ₉ H ₈ O	Fenilpropanóide	<i>Cinnamomum cassia</i> (Lauraceae)	[231]
Eucaliptol (ou 1,8-Cineol)	C ₁₀ H ₁₈ O	Monoterpeno	<i>Eucalyptus</i> spp. (Myrtaceae)	[232]
Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	Fenilpropanóide	<i>Eugenia caryophyllata</i> (Oleaceae) <i>Ocimum basilicum</i> (Labiatae)	[210]
Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	Monoterpeno	<i>Cymbopogon nardus</i> (Poaceae); <i>Corymbia citriodora</i> (Myrtaceae)	[135, 227]
Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	Monoterpeno	<i>Zanthoxylum piperitum</i> (Rutaceae)	[230, 233, 234]
Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	Monoterpeno	<i>Thymus vulgaris</i> (Lamiaceae); <i>Ocimum suave</i> (Lamiaceae); <i>Ocimum basilicum</i> (Lamiaceae)	[226 – 229]
α-Pineno	C ₁₀ H ₁₆	Monoterpeno	<i>Corymbia citriodora</i> (Myrtaceae); <i>Eucalyptus</i> spp. (Myrtaceae)	[230, 235]
β-Mirceno	C ₁₀ H ₁₆	Monoterpeno	<i>Zanthoxylum piperitum</i> (Rutaceae)	[233]
p-Mentano-3,8-diol	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Monoterpeno	<i>Eucalyptus citriodora</i> (Myrtaceae)	[229]
Sabineno	C ₁₀ H ₁₆	Monoterpeno	<i>Zanthoxylum piperitum</i> (Rutaceae)	[208]
α-Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	Monoterpeno	<i>Thymus vulgaris</i> (Lamiaceae)	[226 – 228]
Terpinoleno	C ₁₀ H ₁₆	Monoterpeno	<i>Endostemon tereticaulis</i> (Labiatae)	[135, 225, 230, 235]
Timol	C ₁₀ H ₁₄ O	Monoterpeno	<i>Thymus vulgaris</i> (Lamiaceae); <i>Ocimum suave</i> (Lamiaceae); <i>Ocimum basilicum</i> (Lamiaceae)	[226 – 229]

A produção sistemática de repelentes sintéticos iniciou-se principalmente a partir da segunda guerra mundial devido à necessidade de proteger os soldados da picada de vectores em áreas tropicais e semitropicais [236]. O N,N-dietil-2-metilbenzamida (DEET) foi a substância que se tornou o padrão de repelentes contra artrópodes, sendo desde 1957, o repelente mundialmente mais estudado e comercializado [209]. Actualmente há novamente uma tendência para optar pela utilização de substâncias naturais que sejam mais eficazes e mais duradoras por terem menos riscos ambientais [135, 237].

2.2.2.1.1 Plantas da Madeira com Efeitos Repelentes

Na Madeira existem muitas plantas conhecidas por apresentarem efeitos repelentes contra diferentes insetos [238-240] (Tabela 6-7). Algumas dessas plantas são endémicas ou nativas da ilha enquanto outras foram introduzidas. Das plantas endémicas ou nativas que existem na ilha com efeitos repelentes as mais conhecidas são a arruda (*Ruta chalepensis*), a murta (*Myrtus communis*), a hortelã cabra (*Cedronella caraniensis*), a losna (*Artemisia argentea*) e o loureiro (*Laurus novocanariensis*). Das plantas que foram introduzidas as mais conhecidas são a erva caninha (*Cymbopogon citratus*) e o eucalipto-comum (*Eucalyptus globulus*). Todas estas plantas encontram-se bem adaptadas e distribuídas pela ilha, no entanto, a hortelã cabra, o eucalipto e o louro são mais comuns em zonas montanhosas e mais húmidas, contrariamente à arruda e à losna são muitas vezes encontradas em jardins privados.

Tabela 6: Algumas plantas exóticas e endémicas da Madeira que apresentam efeito repelente nos insetos [238-240] segundo a parte da planta e a sua origem. Abreviaturas: I-Introduzida; N-Nativa; End.: Endémica da Madeira; Mac.-Endémica da Macaronésia.

Família	Nome Científico	Nome Comum	Parte Utilizada	Designação
Apiaceae	<i>Coriandrum sativum</i> L.	Coentro	Fruto; Folha; Caule	I
Asteraceae	<i>Achillea millefolium</i> L.	Mil-folhas	Folha; planta	I
Asteraceae	<i>Artemisia argentea</i> L'Hér	Losna	N.I	End.
Asteraceae	<i>Ageratum conyzoides</i> L.	Erva de são João	Caule e Planta	I
Asteraceae	<i>Chamaemelum nobile</i> L.	Macela (Marcela)	Planta; Flor	I
Asteraceae	<i>Tagetes Minuta</i> L.	Ícaro	Flores; Frutos e Sementes	I
Asteraceae	<i>Tanacetum parthenium</i> L.	Artemija	N.I	I
Labiatae	<i>Cedronella caraniensis</i> L.	Hortelã de cabra	N.I	End.
Labiatae	<i>Hyssopus officinalis</i> L.	Hissopo	Planta; Flor	I
Labiatae	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill	Alfazema	Flor; Folha; Planta	I
Labiatae	<i>Lavandula viridis</i> L'Hér	Rosmaninho	Plantas inteiras com flores	N
Labiatae	<i>Mentha piperita</i> L.	Hortelã Pimenta	Folhas; planta	I
Labiatae	<i>Mentha pulegium</i> L.	Poejo da Serra	Folhas Secas	N
Labiatae	<i>Salvia officinalis</i> L.	Salva	Planta Folhas	I

Tabela 7 (continuação): Algumas plantas exóticas e endêmicas da Madeira que apresentam efeito repelente nos insetos [238-240] segundo a parte da planta e a sua origem. Abreviaturas: I-Introduzida; N-Nativa; End.: Endêmica da Madeira; Mac.-Endêmica da Macaronésia.

Labiataeae	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Segurelha	N.I	I
Lamiaceae	<i>Calamintha nepeta</i> L.	Nêveda; Erva das azeitonas	Planta; Folhas	N
Lamiaceae	<i>Hyssopus officinalis</i> L.	Erva cidreira	Planta Folhas	I
Lamiaceae	<i>Mentha spicata</i> L.	Hortelã verde	Folhas; caule	I
Lamiaceae	<i>Mentha longifolia</i> L.	Menta silvestre	Planta	I
Lamiaceae	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Manjeriço	Flores; Frutos e Sementes	I
Lamiaceae	<i>Origanum vulgare</i> L.	Oregão	Planta	N
Lamiaceae	<i>Teucrium betonicum</i> L'Hér.	Erva branca	N.I	End.
Lauracea	<i>Laurus nobilis</i> L.	Loureiro	Folhas; frutos imaturos	Mac.
Lauracea	<i>Laurus novocanariensis</i> Rivas Mart.	Loureiro	N.I	Mac.
Myrtaceae	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill	Eucalipto	Folhas	I
Myrtaceae	<i>Myrtus communis</i> L.	Murta	Planta	N
Poasea	<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf	Erva caninha	N.I	I
Polygonaceae	<i>Polygonum hydropiper</i> L.	Erva de bicho	Planta	N
Rutaceae	<i>Ruta Chalepensis</i> L.	Arruda	Planta	N
Verbenaceae	<i>Aloysia citrodora</i> Palau	Berbina (Pessegueiro inglês)	Planta	I

2.2.3 Fatores que Afetam a Emissão de Compostos Voláteis

2.2.3.1 Fatores Intrínsecos

2.2.3.1.1 Tipo de Estrutura Secretora

A variação da composição volátil obtida em diferentes partes da planta pode ser explicada pelos diferentes tipos de estruturas secretoras que estão distribuídas heterogeneamente ao longo da planta e ao longo dos diferentes órgãos que a constituem. Os voláteis são produzidos em estruturas secretoras especializadas que minimizam o risco de autotoxicidade e simultaneamente permitem a presença de níveis elevados de componentes metabólicos em locais onde a sua função defensiva ou atrativa pode ser essencial para a sua vida [241].

O tipo e a localização destas estruturas são característicos de cada família de plantas (Tabela 8). Há vários exemplos de plantas com mais do que um tipo de estrutura secretora. Além disso, estas estruturas nem sempre se desenvolvem de uma forma sincrónica e nem sempre segregam os mesmos tipos de compostos e podem ainda ter diferentes processos de secreção. Em alguns géneros de plantas com estruturas secretoras internas, a composição química dos compostos segregados pode ser similar mas a localização das estruturas secretoras pode definir a função final dos compostos na planta [241, 242]. As estruturas secretoras internas são menos propensas a perdas ou transformações de COVs

enquanto as estruturas secretoras externas podem libertar naturalmente os compostos voláteis pela ruptura da cutícula. Estas são as mais vulneráveis a danos mecânicos [241].

Tabela 8: Tipos de estruturas secretoras de substâncias voláteis presentes nas diferentes famílias de plantas [241].

Tipo	Famílias*
Estruturas Secretoras Externas	
Tricomas	Asteraceae, Cannabaceae, Geraniaceae, Lamiaceae, Plumbaginaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Solanaceae, Verbenaceae
Omóforos	Araceae, Orchidaceae, Piperaceae
Estruturas Secretoras Internas	
Idioblastos	Araceae, Aristolochiaceae, Calycanthaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Piperaceae, Saururaceae
Cavidades	Hypericaceae, Leguminosae, Myrtaceae, Myoporaceae, Rutaceae
Ductos/Canais	Anacardiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Hypericaceae, Myrtaceae, Pinaceae

2.2.3.1.2 Tipo de Órgão e Fase de Desenvolvimento

A composição de COVs de uma planta pode variar dependendo do órgão ex. sementes, folhas, caules, flores ou raízes ou segundo o estado de desenvolvimento do órgão [243, 244]. Geralmente a emissão de voláteis em flores ou a acumulação de voláteis em folhas ou frutos seguem padrões semelhantes de desenvolvimento, aumentando durante as fases iniciais do desenvolvimento dos órgãos, ou seja, quando as flores estão prontas para polinização, quando as folhas são jovens ou quando o fruto ainda não está maduro e depois mantêm-se relativamente constantes ou decrescem ao longo da vida do órgão [243 – 247].

Em muitos casos, há um aumento na produção de voláteis quando se inicia a formação do botão da flor até a flor no estado maduro. Alguns compostos voláteis aumentam a sua composição de cerca de 10% nos estágios iniciais até cerca de a 50-70 % em plena fase de floração. Em outros casos os produtos voláteis são largamente acumulados antes do órgão estar completamente expandido [241].

2.2.3.1.3 Danos Químicos, Físicos ou Biológicos

Os danos químicos causados por exemplo pelo tratamento com herbicidas provocam alterações nas estruturas secretoras dos COVs. Também os danos mecânicos causados por exemplo pelo ataque de pragas de insetos herbívoros alteram a composição, a produção e a emissão dos voláteis das plantas [168, 188]. Os danos causados pelos insetos nas plantas podem estimular consideravelmente a emissão

destes compostos em cerca de 2,5 mais do que em plantas intactas [168, 188]. As doenças causadas por vírus ou fungos também alteram a emissão de COVs.

2.2.3.1.4 Variação Genética e Evolução

Estudos mostram que a produção e a emissão de voláteis está sob controlo genético. Desta forma, os mecanismos que levam á evolução da composição volátil são os seguintes: a) duplicação de genes, sendo que um mantém a sua função enzimática original, enquanto que, uma nova função evolui a partir do gene duplicado; b) evolução convergente, onde novas funções surgem várias vezes de forma independente em genes diferentes; c) evolução de um gene existente, sem duplicação, resultando numa nova função enzimática; d) perda da atividade enzimática provocada por diversos factores entre eles rearranjos cromossómicos ou mutações [241, 248]. Em qualquer um destes casos estes processos conduzem a alterações na expressão de genes. Além disso, a diversidade funcional enzimática pode surgir com poucas alterações na estrutura da enzima, e pode ser aumentada quando as enzimas das células de diferentes tecidos ou órgãos são expostas a variáveis ambientais diferentes. A produção de metabolitos novos nas plantas é uma vantagem adaptativa [248].

2.2.3.2 Fatores Ambientais

A produção e a emissão de COVs pelas plantas é extremamente dependente das condições ambientais [241, 249]. A temperatura é um dos factores principais que controlam o desenvolvimento e metabolismo das plantas. Embora cada espécie necessite de uma determinada temperatura para sobreviver, muitas têm a capacidade de suportar uma gama alargada de temperaturas. As variações de temperatura anuais podem ser pequenas em alguns lugares, cerca de 1 °C, ou muito elevadas noutros, cerca de 30 °C. As variações diárias são também importantes. Para cada espécie de planta existe um valor médio de temperaturas óptimo para a produção de COVs. Em geral, em temperaturas ambientais elevadas ocorre um aumento da emissão de COVs [249]. A emissão e produção de COVs também varia ao longo do fotoperíodo, já que a intensidade e quantidade de luz necessária ao desenvolvimento de uma planta é muito variável de espécie para espécie [243]. Durante os meses de temperaturas mais baixas e menor número de horas de luz solar há uma diminuição evidente na produção de COVs [241].

Outros factores que alteram a emissão e produção de COVs são a pluviosidade total e a distribuição desta ao longo do ano, a seca que limita a fotossíntese e a absorção de nutrientes, a humidade, a concentração de dióxido de carbono (CO₂) e ozono (O₃) [171, 250, 251] e ainda a poluição causada por poeiras, fabricas, veículos, entre outros [241].

Existem inúmeros exemplos de variação na composição volátil de plantas da mesma espécie de diferentes áreas geográficas [252, 253]. Isto reflete as diferentes condições ambientais de local para local e as diferentes condições das culturas em função da altitude, tipos de solo, exposição solar, entre outros

[241]. A altitude também influencia a produção e emissão de COVs já que existem espécies de plantas que se desenvolvem ao nível do mar, enquanto que, outras precisam de maiores altitudes. O tipo de solo onde a planta foi cultivada ou nasceu espontaneamente determina a formação e a emissão de COVs. O crescimento e sobrevivência de muitas espécies vegetais é severamente deprimido em solos mal drenados [241]. Diversas variedades de plantas têm necessidades muito diferentes em relação ao tipo de solo, disponibilidade de nutrientes e quantidade de água [171, 250, 251].

2.2.4 Aplicações Industriais dos Compostos Voláteis

Comercialmente, muitos compostos voláteis resultantes de plantas apresentam diversas aplicações industriais devido ao seu odor e sabor característicos. Muitos são utilizados como detergentes, gel de duche, cosméticos ou produtos de perfumaria [188, 254]. Outros são utilizados nos produtos alimentares como aromatizantes, agentes antimicrobianos e antioxidantes ou como medicamentos ou remédios naturais [241].

Compostos voláteis são utilizados no controle e proteção de culturas. Muitos servem para manipular o comportamento das espécies benéficas. Outros são utilizados como insecticidas, que são directamente tóxicos para os organismos alvo, ou como repelentes que impedem a alimentação e afastam as pragas. Podem também ser utilizados como feromonas que alteram o comportamento de pragas [189]. Algumas das vantagens da utilização destes produtos é que são produtos naturais e biodegradáveis não se acumulando no meio ambiente e geralmente não apresentam toxicidade para os mamíferos [241].

2.2.5 Métodos de Extração, Quantificação e Análise dos Compostos Voláteis

A fração volátil de uma matriz de origem vegetal é em geral definida como a mistura de compostos que apresentam capacidade para se vaporizar espontaneamente e/ou sob condições apropriadas ou ainda por recurso a técnicas adequadas. Os produtos voláteis que caracterizam uma matriz vegetal são conhecidos por óleos essenciais, aromas, fragâncias ou extratos obtidos através de técnicas específicas [189]. A escolha do método químico para a extração e análise dos compostos voláteis de uma amostra geralmente depende do tipo de material vegetal a ser investigado. O crescente interesse na composição volátil de uma grande variedade de amostras de plantas tem levado ao desenvolvimento de diversas técnicas extração com o intuito de melhorar a análise destes compostos [189].

2.2.5.1 Métodos de Extração

A extração dos compostos voláteis consiste em romper as células e recolher os compostos de interesse, para isso, pode ser necessário utilizar diferentes técnicas dependendo das propriedades físico-

químicas dos compostos que se pretende extrair, dos coeficientes de partição em água ou solventes orgânicos, da polaridade do composto ou da estabilidade do composto, bem como a temperatura utilizada durante o processo de extração [255, 256]. O número de métodos disponíveis para obter a fracção volátil de uma amostra de plantas é bastante grande mas os mais conhecidos e utilizados são a destilação e extração com solventes.

2.2.5.1.1 Destilação

A destilação na maioria das vezes é realizada como hidrodestilação para libertar, na forma gasosa, os compostos voláteis a partir do material vegetal. Como o rendimento de amostra obtida por esta técnica é tipicamente baixo, é necessário utilizar uma quantidade substancial de material vegetal sendo utilizada como solvente a água. O volume de água deve ser seleccionado de acordo com a quantidade de material vegetal utilizado e com o rendimento de óleo essencial desejado [257].

Na hidrodestilação a mistura (água e material vegetal) é levada à ebulição. A temperatura do vapor é assim suficientemente alta para quebrar a estrutura das células e libertar os compostos voláteis. Desde que o aquecimento seja realizado na presença de água, a pressão de vapor da água aumenta e também a pressão de vapor dos compostos que sobem através de um tubo conetado a outra camara para a sua condensação. Esta técnica apresenta as seguintes desvantagens dentre as quais se pode destacar o fato de ser um processo lento, os rendimentos são tipicamente baixos, os constituintes naturais podem sofrer alteração por possível oxidação devido a acção do calor além de que, podem ocorrer perdas dos compostos mais polares [257].

2.2.5.1.2 Extração Com Solventes

A eficácia deste método depende da correta escolha dos solventes (ex. polaridade), da proporção do solvente na amostra, da duração da extração e da escolha de temperatura para aumentar a solubilidade dos compostos voláteis e melhorar a transferência de massa. Os compostos voláteis de uma amostra vegetal apresentam diferentes polaridades e, até ao momento, não existe nenhum solvente único capaz de extrair toda a vasta gama de compostos existente. A escolha do solvente é assim um passo muito importante e limitado. Na verdade, muitas vezes, é necessário a utilização de diferentes solventes para se obter um perfil mais completo de todos os voláteis da amostra. Qualquer que seja o solvente utilizado para cada metabolito, existe uma quantidade máxima que pode ser dissolvida, ou seja, a razão entre solvente e amostra é um factor importante [256]. O tempo dessa dissolução depende essencialmente das características físico-químicas e da proporção de solvente e do tipo de amostra [256]. A trituração e homogeneização da amostra são processos que também melhoram a extração já que permitem a ruptura das paredes celulares e um melhor contato com o solvente [258].

2.2.5.1.3 Microextração em fase sólida ou *Headspace* (HS-SPME)

Durante as últimas décadas a técnica de microextração em fase sólida conhecida como microextração em fase sólida ou *Headspace* (HS-SPME) tem vindo a ser muito utilizada para a obtenção de voláteis de plantas intactas ou danificadas. Esta técnica em combinação com a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa dá informação mais completa da composição volátil de uma amostra [189].

A microextração em fase sólida – *Headspace* (HS-SPME) foi desenvolvida no sentido de facilitar a preparação de uma amostra para análise. Esta técnica tem sido considerada como uma das invenções mais brilhantes para preparação, extração e concentração de COVs presentes numa amostra.

Neste método a amostra é colocada num recipiente fechado sem circulação de ar, já que o fluxo de ar poderia contaminar e dificultar a detecção e abundância dos compostos [189]. O HS-SPME baseia-se na adsorção¹ dos analitos numa fibra de sílica fundida, recoberta por uma fina camada de sorvente (Figura 3). A fibra é anexada dentro de uma agulha de uma seringa modificada. Os voláteis são recolhidos quando a fibra é exposta directamente na amostra ou no *headspace* da amostra que por partilha concentra o analito na superfície (sorvente). A fibra permanece vários minutos em contato com a amostra até o equilíbrio ter sido atingido. Em seguida, a fibra é retirada e transferida para um injector de cromatografia gasosa (GC) ou de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A fibra é exposta e o analito é desadorvido termicamente, no caso do GC, ou eluído pela fase móvel, no caso do HPLC, sendo subsequentemente analisado pelas técnicas cromatográficas inerentes aos referidos equipamentos.

A HS-SPME apresenta como vantagens ter uma elevada sensibilidade e simplicidade, necessidade de apenas um pequeno volume de amostra, ter menor custo de análise e um tempo de extração curto que pode ser reduzido apenas a alguns minutos e, além disto, esta técnica elimina a necessidade de utilizar solventes que podem conter impurezas e interferir com a análise da amostra [259, 260]. Esta técnica pode ser aplicada com sucesso para compostos polares e não polares de amostras gasosas, líquidas ou sólidas e pode ser facilmente combinada com vários instrumentos analíticos tais como GC, GC-QMS, HPLC e/ou LC-MS [261]. Outros aspectos importantes desta técnica são a reprodutibilidade, a repetibilidade e a estabilidade da fibra bem como a possibilidade de fazer determinações quantitativas dos constituintes [259].

¹ **Adsorção** é o termo químico utilizado no processo em que os voláteis de uma amostra ficam “agarrados” sem se misturarem sobre uma superfície (neste caso a superfície utilizada é o polímero da fibra utilizada em SPME).

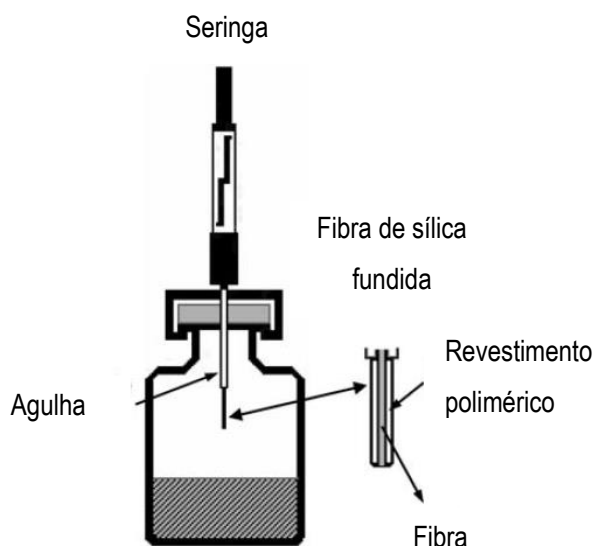


Figura 3: Técnica de Microextração em fase sólida em modo headspace (HS-SPME) [189].

2.2.5.1.3.1 Seleção da Fibra

Vários tipos de fibras de diferentes espessuras e polaridades com grande seletividade para analitos diferentes estão disponíveis comercialmente (Tabela 9). Na extração de voláteis, a polaridade da fibra deve corresponder à polaridade do analito, ou seja, as fibras não polares devem ser utilizadas para analitos não polares, enquanto que as fibras polares devem ser utilizadas para analitos polares. Uma maior espessura da fase estacionária é melhor para compostos voláteis, enquanto que uma fase mais fina é adequada para moléculas maiores [259].

Tabela 9: Características das fibras disponíveis comercialmente segundo, a sua espessura, polaridade e o tipo de compostos a extrair [259].

Fases Estacionárias	Espessura do Revestimento	Polaridade da Fibra	Tipo de compostos
Polidimetilsiloxano (PDMS)	7, 30 ou 100 μm	Não polar	voláteis
Poliacrilato (PA)	85 μm	Polar	semi-voláteis
Carbomax/divinilbenzeno (CW/DBV)	65 μm	Polar	álcoois e compostos voláteis
Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB)	65 μm	Não Polar	voláteis, aminas e compostos nitro aromáticos
Divinilbenzeno/carboxene/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS)	50/30 μm	-	odores

2.2.5.1.3.2 Optimização da Extração

A quantidade de substância extraída pela fibra depende não só da sua polaridade e espessura, como também do tempo do processo e da concentração dos analitos presentes na amostra. A extração dos analitos pode ser melhorada por agitação, por alteração do pH a través e/ou por aumento da temperatura [261]. O tempo de extração é determinado principalmente pela velocidade de agitação e pelo coeficiente de partição do analito entre o revestimento da fibra e matriz da amostra. A agitação magnética é o tipo de agitação mais utilizada. Este processo acelera a transferência de analitos a partir da matriz para a fibra, no entanto, uma agitação muito rápida pode causar uma mudança no tempo de equilíbrio e resultar numa pobre precisão das medições [261]. A eficácia da extração também pode ser melhorada através da adição de sais, tais como cloreto de sódio, hidrogenocarbonato de sódio, carbonato de potássio ou sulfato de amónio. A supersaturação da amostra com sais é mais eficaz para a extração de substâncias a analisar para a fibra, devido ao efeito de *salting-out*. Em geral a amostra pode ser acidificada para extração dos analitos ácidos ou tornada alcalina para extração dos analitos básicos [259].

2.2.5.1.3.3 Optimização da Desorção

A desorção² dos analitos na camara de injeção do GC é dependente da volatilidade do analito, da espessura e do revestimento da fibra, da profundidade de injeção, da temperatura de injeção e do tempo de exposição da amostra. O injector *split/splitless* deve ser usado na forma *splitless* para evitar a perda dos compostos voláteis extraídos. A temperatura óptima de desorção é aproximadamente igual a do ponto de ebulição da substância a analisar. O tempo de desorção depende da temperatura do injector [259, 261].

2.2.5.3 Método de Quantificação e Análise

2.2.5.3.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (GC-qMS)

A cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa em modo de quadruplo (GC-qMS) é uma técnica instrumental através da qual misturas complexas de substâncias químicas podem ser separadas, identificadas e quantificadas [262]. Para que um composto possa ser analisado por GC-qMS ele deve ser suficientemente volátil e termicamente estável. As amostras são geralmente analisadas como soluções orgânicas, assim as matérias de interesse têm de ser extraídos com solvente

² **Desorção** é o termo químico utilizado no processo em que os voláteis de uma amostra se soltam da superfície onde estavam “agarrados” sem se misturarem (neste caso a superfície utilizada é o polímero da fibra utilizada em SPME).

adequado, ou na ausência de solvente (SPME) e o extrato submetido a clean-up antes da sua análise por GC-qMS.

Existem diferentes configurações GC-qMS mas todas elas partilham tipos comuns de componentes, um injetor (onde a amostra é introduzida), um gás de arraste, válvulas de controlo com controlador de temperatura de forno e um programador microprocessador, tubagem para ligar o injetor à coluna e a coluna à interface do espectrómetro de massa. A coluna capilar é revestida com uma fase estacionária adequada para separação dos compostos e a interface serve para transferência dos compostos separados (no GC) para o MS. O espectrómetro de massa é formado por uma fonte de ionização, analisador de massa e um detetor de iões. Finalmente, todos os GC-QMS apresentam um sistema de aquisição e controlo de dados (Figura 4) [263].

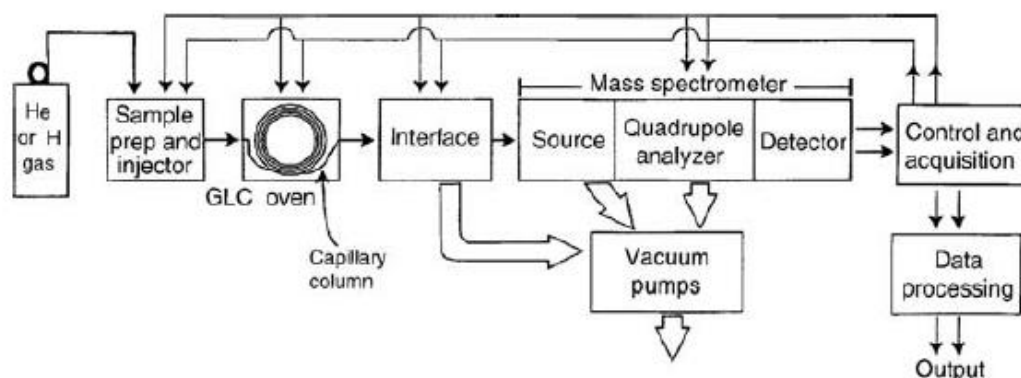


Figura 4: Diagrama típico do sistema GC-qMS [263].

A amostra é injetada na entrada do GC onde é vaporizada e arrastada por um gás de transporte (geralmente hélio – fase móvel) para uma coluna cromatográfica capilar que suporta a fase estacionária. Assim, a amostra flui pela coluna e os compostos de interesse são separados em consoante o seu grau de interação com a fase estacionária da coluna. Uma das extremidades da coluna passa através de uma linha de transferência aquecida (interfase) e entra no MS. Neste os compostos eluídos diferentemente no GC são ionizados [263].

Existem dois métodos possíveis para a produção de iões, o mais utilizado é o de ionização por impacto electrónico (EI) e o outro, utilizado ocasionalmente como alternativa, é o de ionização química (CI). No EI um feixe de electrões ionizam as moléculas da amostra, originando o ião molecular, M^+ (catião radical). Quando o fragmento resultante deste ião é visto no espectro de massa fornece-nos o peso molecular do composto. Quando o impacto electrónico é excessivamente energético, o ião molecular fragmenta-se produzindo fragmentos iónicos de menor massa molecular. Esta informação é usada para identificar os compostos de interesse e ajuda a determinar a estrutura dos componentes das misturas

desconhecidas. O método CI começa com a ionização do metano (ou outro gás adequado) formando um radical que por sua vez irá ionizar a molécula da amostra $[M+H]^+$. Este tipo de ionização é uma menos energética originando menos fragmentos iónicos do que com EI, e desta forma na CI a informação sobre a estrutura da molécula não é tão detalhada, no entanto, pelo facto de ser menos extensiva o ião molecular está sempre presente, contrariamente á EI onde na maioria das vezes a visualização do fragmento iónico correspondente ao ião molecular é difícil, complicando desta forma a elucidação estrutural. Uma vez ionizada, os fragmentos iónicos são repelidos para fora da camara de ionização [263].

O componente seguinte é um analisador de massa, o qual separa e alinha os iões de acordo com a sua massa/ carga (m/z). Existem vários tipos de analisador, os quádruplos, armadilhas de iões, o sector magnético, tempo de voo, radio frequência, entre outros. Os mais comuns são os quádruplos e armadilha de iões. Após os iões serem separados e alinhados da frequência mais alta para a mais baixa eles passam para um detetor produzindo um espetro de massa [263].

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material Biológico

3.1.1 Insetos: Estirpe Utilizada e Métodos de Criação

Foram utilizados indivíduos adultos de *C. capitata* dos dois sexos pertencentes a estirpe Vienna 7 mix 2000. Esta estirpe, desenvolvida pelos geneticistas da FAO/IAEA, na Unidade de Entomologia em Seibersdorf na Áustria, caracteriza-se por possuir duas variações genéticas, a primeira corresponde à cor da pupa, sendo as pupas dos machos castanhas e as pupas das fêmeas brancas, e a segunda corresponde a uma alteração nas fêmeas que passam a apresentar sensibilidade letal a temperaturas acima dos 34°C [264, 265]. Estas duas características são úteis durante a criação porque permitem a separação das pupas do dois sexos e a posterior eliminação das fêmeas durante a criação. Os indivíduos utilizados neste estudo não foram esterilizados sendo provenientes da Biofábrica da Camacha (Madeira) que cria através do Programa Madeira-Med insetos desta estirpe desde o ano de 1998. Os adultos foram criados e mantidos num ambiente com uma temperatura média de $23,3 \pm 1$ °C, a uma percentagem de humidade relativa média foi de 47 ± 1 %, a uma luminosidade média de 235 ± 11 lux e um fotoperíodo de 14L/10 D.

3.1.2 Seleção e Recolha das Espécies de Plantas Utilizadas

3.1.1.2 Seleção das Espécies

Neste trabalho foram utilizadas cinco plantas: a arruda, *Ruta chalepensis* L., a cedronela, *Cedronella canarienses* L., o eucalipto *Eucalyptus globulus* Labill; o louro, *Laurus novocanariensis* Rivas-Mart. e a murta, *Myrtus communis* L.. Estas plantas foram selecionadas não são só por apresentarem efeito repelente contra algumas espécies de insetos (Tabela 5), como também pela sua grande abundância e disponibilidade na RAM. Além de que, são de fácil utilização por parte dos agricultores e podem ser cultivadas em diferentes localidades da Ilha.

3.1.2.2 Recolha das Plantas

No momento da colheita de qualquer material vegetal é necessário ter em conta vários aspetos que podem alterar a sua composição volátil como, a época de colheita, tipo de órgão a utilizar, fase de desenvolvimento [243, 245, 266, 267], local de onde foi recolhido (área geográfica), hora da colheita [243, 268] e ainda se havia presença ou ausência de ataque por parte de insetos, fungos ou vírus [256].

Por forma a uniformizar as recolhas, as folhas adultas das partes aéreas das diferentes espécies de plantas foram recolhidas sempre na parte da manhã entre as 08:00 h e as 10:00 h em Machico e/ou Camacha entre os meses de Outubro e Dezembro de 2012. As folhas das plantas de arruda, cedronela e louro foram recolhidas em jardins diferentes durante o seu período vegetativo. Todas estavam expostas ao sol e ao seu redor estavam muitas outras plantas todas em bom estado, aparentemente sem infeções provocadas por fungos ou vírus. As amostras de plantas naturalizadas de eucaliptos e murta foram recolhidas após a altura de frutos no primeiro caso e antes da altura de frutos no segundo caso. Estas amostras foram recolhidas de locais soleados, e em redor verificou-se a presença de muitas outras plantas todas em bom estado, aparentemente sem infeções provocadas por fungos ou vírus (Tabela 10). As amostras das plantas foram depositadas no herbário da Universidade da Madeira.

Tabela 10: Características das plantas utilizadas nos bioensaios.

Nome Científico	Origem [269]	Distribuição na Ilha [269]	Local de Recolha	Mês/ Data de Recolha	Estado vegetativo
<i>Ruta chalepensis</i> L. (Rutaceae)	Autóctone	Cultivada para fins medicinais e de superstição.	Machico (latitude: 32°44'8.86"N; longitude: 16°48'11.29"W):	Outubro (24/10/12)	Antes Florescimento
<i>Cedronella canariensis</i> L. (Lamiaceae)	Endémica da Madeira, Açores e Canárias	Frequentemente encontrada em locais sombrios, geralmente acima dos 50 m de altitude.	Camacha (latitude: 32°40'18.91"N; longitude: 16°50'52.91"W)	Outubro (10/10/12)	Estado Vegetativo
<i>Eucalyptos globulus</i> Labill (Myrtaceae)	Introduzida da Tasmânia	Cultivada principalmente a média altitude em zonas de montanha ou espontânea nas próprias zonas de cultura e nas zonas próximas.	Camacha (latitude: 32°40'22.96"; longitude: 16°51'0.14"W)	Novembro (13/11/12)	Após altura de frutos
<i>Laurus novovanariensis</i> Rivas Mart. (Lauraceae)	Endémica da Madeira e Canárias	Cultivada para fins ornamentais e condimentares e/ou frequentemente encontrada nas Laurissilva a altitudes entre os 200 a 1500 m	Camacha (latitude: 32°40'20.81"N; longitude: 16°50'51.09"W)	Novembro (28/11/12)	Estado vegetativo
<i>Myrtus communis</i> L. (Myrtaceae)	Autóctone	Cultivada para fins ornamentais ocorre de forma espontânea em inconstas e precipícios em locais expostos, entre 100 a 1000 m de altitude	Machico (latitude: 32°44'6.66"N; longitude: 16°48'18.28"W)	Novembro (27/12/12)	Em altura de frutos

3.2 Preparação, Extração e Análise dos Compostos Voláteis da Proteína e dos Extratos das Plantas

3.2.1. Preparação da Amostra e Extração dos Compostos Voláteis da Proteína

3.2.1.1 Preparação das Amostras de Proteína

A amostra de proteína alimentar utilizada nos bioensaios foi preparada de igual forma à proteína alimentar utilizada na alimentação dos adultos em laboratório. Esta proteína comercializada como FNI 210 é vendida em forma de pó (Bio-Ingredientes LaLLEMAND, composição química (ANEXO 1)) [89]. Quimicamente é obtida a partir da levedura de cerveja *Saccharomyces cerevisiae*. Na preparação do alimento colocou-se num vidro de relógio 1 g de proteína para cada 3 g de açúcar e humedeceu-se com 0,1 ml de água destilada.

3.2.1.2 Extração dos Compostos Voláteis da Proteína

Para a extração dos compostos voláteis da proteína alimentar utilizou-se a fibra tripla de SPME DVB/CAR/PDMS com 50/30 µm de diâmetro. Pesou-se cerca de 0,1 g proteína alimentar dentro de um *vial* com um pequeno orifício na tampa. Neste introduziu-se manualmente a fibra durante cerca de 30 minutos e ao fim desse tempo, a fibra foi recolhida e inserida no GC-QMS para desorção, separação e identificação dos compostos voláteis.

3.2.2. Preparação dos Extratos das Plantas e Extração dos Compostos Voláteis

3.2.2.1 Preparação dos Extratos das Plantas

A preparação dos extratos das plantas compreendeu vários passos, entre eles, a extração dos compostos de interesse, a filtração e o congelamento da amostra até à sua utilização. Efetuou-se a preparação dos extratos das plantas à temperatura ambiente utilizando como solvente a água destilada. Evitou-se a utilização de outros solventes orgânicos assim como a utilização de temperaturas elevadas porque ambos podem provocar alterações qualitativas e quantitativas na composição volátil da amostra devido à decomposição e/ou alteração dos compostos químicos [258]. Por este mesmo motivo as plantas foram tratadas logo após recolha. Primeiro foram transportadas para a Biofábrica da Camacha onde procedeu-se ao tratamento das amostras. Para tal, cerca de 50 g de folhas foram pesadas e moídas, em seguida, foi adicionado cerca de 100 ml de água destilada e deixada a solução com concentração de 0,5

g/ml a repousar aproximadamente de 1h de forma a permitir a dissolução das partículas da amostra no solvente [255].

Posteriormente, a mistura foi filtrada e o extrato foi recolhido em frascos de aproximadamente 2 ml e conservados no frio (- 4 ° C) até à sua utilização. O congelamento é um dos métodos de conservação mais utilizado para prolongar e conservar o conteúdo de uma amostra ainda que as reações químicas, bioquímicas e fisiológicas não cessam completamente durante o arrefecimento. Embora a análise do efeito repelente dos extratos no comportamento dos insetos devesse ser feita, preferencialmente logo após a recolha do extrato, de modo a garantir os valores próximos e exatos de todos os componentes voláteis, tal não foi possível, devido à quantidade de testes delineados neste trabalho, por isso procedeu-se ao congelamento das amostras em várias alíquotas. No entanto, alguns trabalhos realizados com insetos mostram que não há diferenças na resposta dos insetos a extratos congelados ou frescos da mesma planta [270].

Os principais equipamentos utilizados na preparação dos extratos das plantas e bioensaios encontram-se resumidos na tabela 11.

Tabela 11: Resumo dos principais equipamentos utilizados.

Equipamentos	Marca
Detetor portátil de temperatura e humidade relativa	HANNA Instruments, HI 9564
Detetor portátil de luminosidade	Sinometer LX1010B
Balança Analítica	METTLER Toledo Sb12001
Moinho	BeCKEN 150W
Estufa	WTCBinder

3.2.2.2 Extração dos Compostos voláteis

Cada extrato foi retirado do congelador no dia em que foi realizada a análise da composição volátil tendo sido previamente deixado descongelar aproximadamente durante uma hora. Para a extração dos compostos voláteis dos extratos utilizou-se a fibra tripla DVB/CAR/PDMS com 50/30 µm de diâmetro. Colocou-se cerca de 2 ml de extrato dentro de um *vial* e para se obter um perfil mais completo dos voláteis da amostra adicionou-se 10 % de NaCl cerca de 0,2 g. Posteriormente, o *vial* com a mistura foi colocado em banho-maria com agitação magnética a 40°C e, logo de seguida, a fibra foi inserida durante cerca de 30 minutos. Ao fim desse tempo, a fibra foi recolhida e inserida no GC- MS para a análise dos compostos.

3.2.3 Condições Utilizadas na Cromatografia Gasosa acoplado à Espectrometria de Massa (GC-QMS)

Para quantificação e análise de compostos voláteis recorreu-se à GC-qMs. Uma vez recolhidos os voláteis na fibra, esta foi introduzida na porta de injeção do GC, onde foi mantida durante 6 minutos para a adsorção dos compostos. O injetor *split/splitless*, operando no modo de *splitless* foi equipado com um *linner* para SPME (diâmetro interno 0,75 mm I.D., Supelco, Barcelona, Espanha). Os metabolitos desorvidos foram separados por um sistema GC (Agilent Technologies 6890N) equipado com uma coluna de sílica fundida capilar BP-20 (30 m x 0,25 mm I.D. x 0,25 μ m espessura da película) fornecido pela SGE (Darmstadt, Alemanha). Este sistema foi ligado a um detetor de massas quadruplo seletivo 5973N Agilent. O hélio (Air Liquide, Portugal) foi utilizado como gás de arraste com um fluxo constante de 1,1 mL / min (Pressão à entrada da coluna: 12 psi). A temperatura do forno do GC foi programada da seguinte forma: 40 ° C por 1 min, 1,5 ° C / min ° até 180 ° C (1min), depois sobe para 220 ° C a 35 ° C / min e é mantido isotermicamente a 220 ° C por mais 1 minuto (Figura 5).

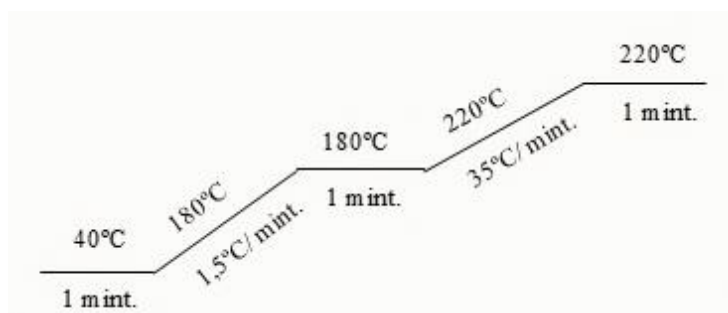


Figura 5: Rampa de temperaturas utilizadas no GC-QMS na análise dos compostos voláteis presentes no fluxo de ar e nas amostras de trimedlure, proteína e extratos das plantas.

Para o sistema de MS, as temperaturas do injetor, do detetor e da fonte de ionização foram 150, 180 e 230 ° C, respetivamente. Os fragmentos iónicos foram obtidos por impacto de electrões (EI) a 70 eV com uma corrente de ionização de aproximadamente 30 μ A. Os dados de aquisição foram realizados em modo de varredura (faixa de massa m/z 30-300; 6 scans/s). A área do pico de cada composto foi obtida a partir do cromatograma de extração de iões (IEC), seleccionando os iões alvo para cada composto identificado. A repetibilidade foi expressa como desvio padrão relativo (RSD). A aquisição de sinal e de processamento de dados foram realizadas utilizando o software HP Chemstation (Agilent Technologies).

3.3 Bioensaios

3.3.1 Descrição e Funcionamento do Olfatómetro

Os estudos do comportamento dos insetos aos compostos voláteis foram realizados num olfatómetro de dupla escolha em forma de Y (Demas [271]; Koschier [272] and George [273]). O olfatómetro em forma de Y é um tubo de vidro transparente com 2 cm de diâmetro interior, formado por uma base com 30 cm de comprimento e dois braços cada um com 10 cm de comprimento formando entre si um ângulo de cerca de 25° (Figura 6). O final de cada um dos braços encontra-se ligado a uma mangueira de plástico por onde passa um fluxo de ar. O fluxo de ar bombeado por uma bomba de vácuo (LABOPORT, 2,4 bar) é passado por um sistema de carvão ativado de forma a filtrar o ar eliminando odores e outras impurezas. Posteriormente, o ar passa por um sistema de água destilada para ser humidificado, e entra separadamente em cada um dos braços do olfatómetro até à base do tubo. O ar é recolhido através de uma mangueira de plástico ligada à base do tubo e volta para a bomba. O fluxo de ar à entrada de cada um dos braços do olfatómetro é cerca de 120 mL/min.

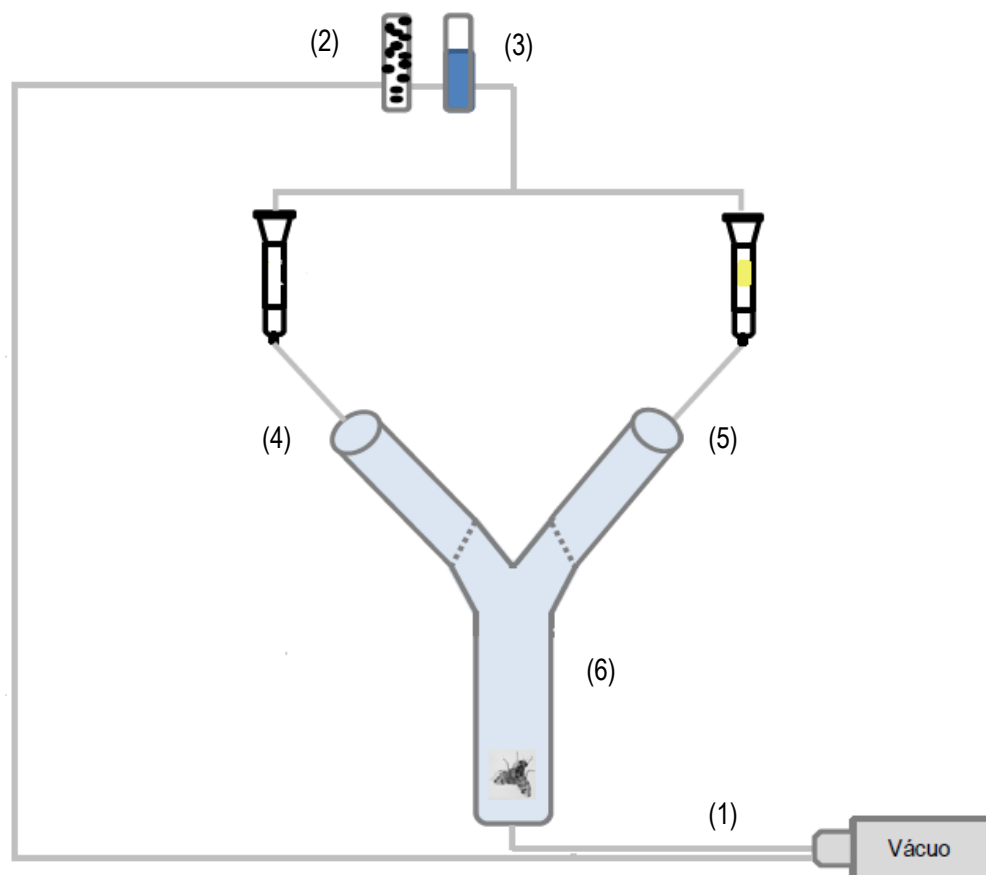


Figura 6: Olfatómetro em forma de Y utilizado nos bioensaios. (1) bomba de vácuo; (2) carvão ativado; (3) água destilada; (4) (5) braços do olfatómetro; (6) centro.

3.3.2 Estandarização das Condições dos Bioensaios

3.3.2.1 Análise do Fluxo de Ar

Para evitar falsas respostas e/ou a confusão dos insetos, o fluxo de ar dentro do olfatómetro deve estar isento de voláteis além dos da amostra [155]. Contudo, pode haver contaminação do fluxo de ar que circula dentro do olfatómetro. Os compostos voláteis interferentes podem ter diferentes origens:

- serem libertados pelo material utilizado no aparelho ex. as mangueiras, rolhas e/ou tecidos;
- proceder do ar circundante do exterior quando aspirado pela bomba e direcionado para o interior do olfatómetro;
- resultar da acumulação/aglomeração de voláteis nas paredes e material do olfatómetro provenientes das amostras que foram previamente testadas;
- terem sido libertados pelos insetos durante cada teste.

Para avaliar a ausência de contaminantes voláteis do ar fez-se uma análise do fluxo de ar que circulava no interior do olfatómetro. Para isto foi utilizado a técnica HS-SPME seguida de análise por GC-QMS (3.2.3). Para tal, o olfatómetro e todo o material utilizado foi lavado com água destilada e seco, sendo posteriormente montado. O fluxo de ar foi ligado e deixado circular durante cerca de 10 minutos e, após esse tempo, a fibra tripla de DVB/CAR/PDMS foi introduzida no centro do olfatómetro durante cerca de 30 minutos sendo posteriormente introduzida no GC-QMS.

3.3.2.2 Dispersão de Voláteis

O fluxo de ar que sai da bomba é canalizado através dos dois braços do olfatómetro. Parte do ar passa pelo braço com a amostra e a outra parte passa pelo outro braço, sem amostra que serve de controlo. O fluxo de ar com os voláteis da amostra e o fluxo de ar do braço sem amostra (controlo) são arrastados até ao centro do olfatómetro onde se misturam (Figura 7 I). Os insetos que se dirigem do centro do tubo uma vez que entram no braço com a amostra é considerado que respondem positivamente. Para relacionar possíveis diferenças nas respostas dos insetos com a concentração da amostra utilizada foi verificado o modo de dispersão dos voláteis dentro do olfatómetro já que eventualmente o ar poderá concentrar-se numa parte do tubo e/ou entrar no braço contrário se o fluxo de ar não for o suficiente. Para verificar a dispersão dos voláteis no interior do olfatómetro foi utilizado o trimedlure (TML). Este composto altamente volátil é idêntico à feromona sexual dos machos de *C. capitata*. O TML é um dos atrativos sintéticos mais utilizados em armadilhas no campo para deteção da mosca da fruta. O TML ($C_{12}H_{21}ClO_2$) (cas number 12002-53-8) consiste numa mistura de oito isómeros de *terc*-butil ésteres dos ácidos 4- e 5-cloro-2-metilciclohexano carboxílicos, é comercializado em doses de

cerca de 2g num tampão polimérico que proporciona a libertação controlada do atrativo até cerca de oito semanas [274].

Para análise da dispersão de voláteis utilizou-se novamente a técnica HS-SPME seguida de análise por GC-QMS (3.2.3). O TML foi colocado dentro de um braço do olfatómetro e o fluxo de ar foi ligado cerca de 10 minutos. Após esse tempo, a fibra tripla DVB/CAR/PDMS foi inserida no interior do olfatómetro durante cerca de 30 minutos sendo, findos quais foi removida e inserida no GC-QMS (3.2.3). Realizaram-se separadamente 4 recolhas da composição volátil do TML em 4 pontos diferentes do olfatómetro (braço com amostra, braço sem amostra, centro e base), para posterior comparação (Figura 7 II).

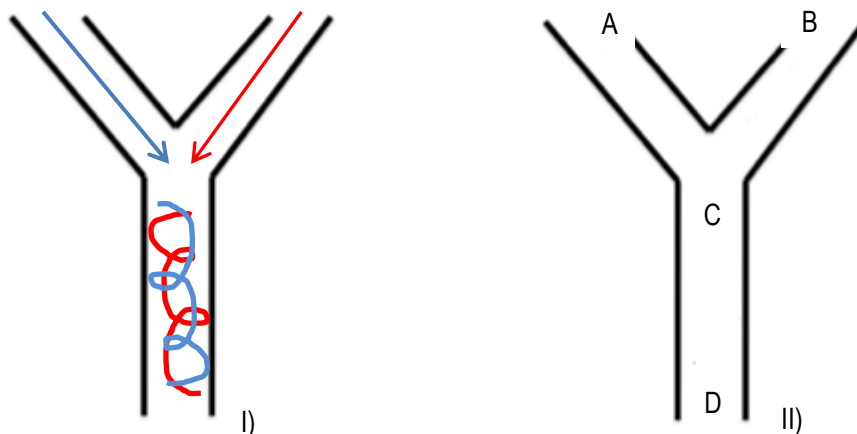


Figura 7: Olfatómetro em forma de Y. I) representação da direção da dispersão dos voláteis esperada dentro do olfatómetro; II) pontos dentro do olfatómetro de onde foram recolhidas as amostras de ar A=braço com amostra; B=braço sem amostra (controle); C= centro do olfatómetro; D=base do olfatómetro.

3.3.3 Análise da Resposta dos Insetos

Na análise das respostas dos insetos é necessário definir alguns termos como: teste, bioensaio, repetição e tipo de resposta (positiva, negativa e não resposta) os quais foram utilizados de forma consistente ao longo do trabalho.

Bioensaio: ensaio realizado com indivíduos do mesmo sexo (machos, fêmeas), estado sexual (virgens, não virgens) com a mesma idade e com o mesmo número de indivíduos por grupo;

Repetição: número de vezes que é realizado cada bioensaio com os mesmos indivíduos;

Teste: conjunto de todos os bioensaios que foram realizados com indivíduos do mesmo sexo (machos, fêmeas), e estado sexual (virgens, não virgens) independentemente da idade e número de indivíduos por grupo;

Resposta Positiva: quando um inseto se encontra entre o ponto C e A do olfatômetro (Figura 6 II). As respostas positivas correspondem ao número total de insetos que responderam positivamente em cada bioensaio;

Resposta Negativa: quando os insetos se encontravam entre o ponto C e B do olfatômetro (Figura 6 II);

Não Resposta: quando os insetos se encontravam entre os pontos C e D do olfatômetro (Figura 6 II).

3.3.3.1 Manuseamento dos Insetos Utilizados nos Bioensaios

Os insetos utilizados foram machos virgens e fêmeas virgens e não virgens com idades compreendidas entre os 5 e os 20 dias. Os insetos utilizados não foram esterilizados através de radiação. Inicialmente, as pupas foram separadas por sexos consoante a cor e os indivíduos de cada sexo foram colocados em caixas diferentes. À medida que os adultos emergiam eram transferidos para outras caixas de plástico de forma a garantir que em cada caixa todos os indivíduos do mesmo sexo tivessem a mesma idade. As caixas de plástico transparente utilizadas apresentam forma rectangular com 40 cm de comprimento e 30 cm de largura e 30 cm altura (Figura 8). De forma a evitar possíveis alterações no comportamento dos adultos causado pelas libertações de feromonas do sexo oposto após emergência dos adultos, as caixas com os machos foram separadas das caixas das fêmeas e mantidas em salas diferentes [275]. Todos os insetos foram alimentados com proteína e açúcar numa relação de 1/3 colocadas em placas de Petri sendo a água disponibilizada num algodão humedecido.

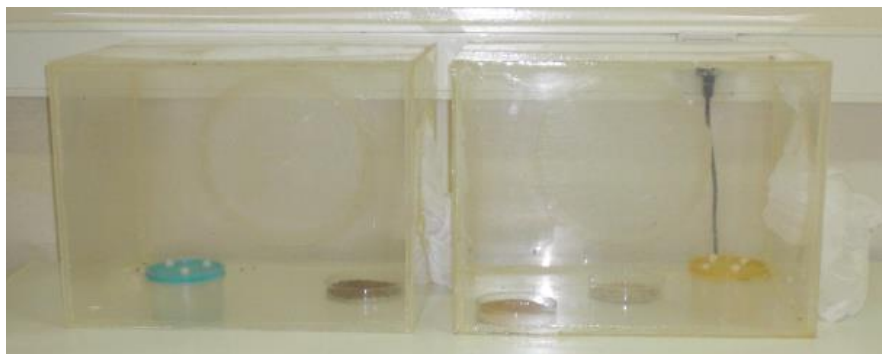


Figura 8: Caixas utilizadas durante a criação de adultos de *C. capitata*.

3.3.3.2 Condições dos Bioensaios

Os bioensaios foram conduzidos como descrito previamente por George [273], numa sala separada do local de criação em ambiente controlado. Todos os bioensaios foram realizados sempre no mesmo local da sala. As características da sala eram: ausência de corrente de ar e luz natural, ausência de janelas, presença de uma porta de alumínio branca, parede de cor creme, apenas presente um pequeno armário de alumínio cinzento em local contrário à realização dos bioensaios.

Todos os bioensaios decorreram entre as 9:00 e as 16:00h. À entrada de cada um dos braços do olfatómetro foram colocados quadradinhos de papel de filtro com cerca de 0,5 cm de largura e 2,5 cm de comprimento, sendo num aplicada a amostra e o outro, sem amostra, que serviu de controlo. O olfatómetro foi colocado com um ângulo de 60° em relação ao plano horizontal em cima de uma superfície branca opaca. A bomba de vácuo foi ligada durante cerca de 10 minutos antes de cada bioensaio para a circulação dos voláteis da amostra antes de se introduzir os insetos. Os insetos foram introduzidos manualmente à entrada do tubo principal do olfatómetro através de um aspirador, sendo que durante a introdução dos insetos no olfatómetro o fluxo de ar foi mantido ligado. O tempo máximo de cada bioensaio foi de 30 minutos, sendo que, a resposta dos insetos foi anotada ao final dos 10, 20 e 30 minutos. No final de cada bioensaio o olfatómetro foi lavado com água destilada e colocado a secar dentro de uma estufa a 60 °C.

3.3.3.3 Análise da Resposta dos Insetos à Proteína Alimentar

Na análise da resposta dos insetos à proteína alimentar foram utilizados um total de 1980 insetos, sendo utilizados por teste 660 machos virgens, 660 fêmeas virgens e 660 fêmeas não virgens. Por idade foram utilizados um total de 165 insetos divididos em grupos de 5 com 30 insetos, grupos 10 com 45 insetos e grupos de 15 com 90 insetos. Foram realizados um total de 216 bioensaios cada um repetido 3 vezes. Antes de se iniciar os bioensaios todos os insetos foram deixados em jejum cerca de 1 hora. No início de cada um dos bioensaios foi preparada e utilizada como atrativo uma 1 g de proteína alimentar. Os bioensaios foram conduzidos numa sala de ambiente controlado com temperatura média de $23,5 \pm 2$ °C, percentagem de humidade relativa média de 47 ± 4 %, luminosidade média de 235 ± 11 lux e um fotoperíodo de 14L/10 D. Foram contabilizados como *respostas positivas* os insetos que se dirigiram ao braço no qual fora colocada a amostra, como *respostas negativas* os insetos que se dirigiam ao braço sem amostra e, como *não respostas* foram contabilizados os insetos que não se deslocaram a nenhum dos braços.

Além da resposta dos insetos à proteína alimentar foram consideradas outras variáveis suscetíveis de influenciar a resposta dos insetos durante os bioensaios como, o número de repetições

realizadas com os mesmos insetos, o braço do olfatómetro no qual é colocada a amostra (braço direito ou esquerdo), o tempo de duração do bioensaio, o número de indivíduos utilizado em cada bioensaio, as condições dos insetos como o sexo, a maturidade sexual e a idade.

Número de Repetições: A resposta de um inseto aos compostos voláteis pode ser alterada consoante o número de vezes que este está em contato com o composto, por exemplo, pode haver habituação ao mesmo. Igualmente com o tempo, os insetos podem não responder por cansaço físico ou fisiológico, por exemplo, causado pela saturação dos recetores das antenas, devido ao tempo prolongado de contato com a amostra. Por bioensaio o número de repetições consideradas com os mesmos insetos foram 3.

Efeito da posição dos braços do olfatómetro: A resposta aos compostos voláteis pode variar entre os dois braços do olfatómetro, ou seja, os insetos podem ter a tendência de se dirigir mais para um braço do que para outro [272]. Isto pode muitas vezes ser devido à presença de estímulos externos como por exemplo, maior claridade num braço do que noutro. Para excluir possíveis efeitos do braço do olfatómetro, após cada ensaio a posição do braço em que era colocada a amostra foi rodada para o lado oposto do ensaio anterior ou seja, os mesmos insetos a amostra foi colocada no mesmo braço

Tempo de duração dos bioensaios: Num mesmo bioensaio, a resposta a estímulos olfativos pode ser influenciada pelo tempo de duração do bioensaio, já que com o tempo os insetos podem responder mais ou menos ao estímulo por este motivo para os mesmos insetos foram registadas as respostas aos 10, 20 e 30 minutos.

Número de Indivíduos por bioensaio (5, 10, 15): Os insetos muitas vezes têm comportamentos diferentes quando sozinhos ou quando em grupo. Os machos de *C. capitata* normalmente na natureza foram leks ou grupos de 2 a 10 indivíduos para o acasalamento enquanto, que as fêmeas não formam grupos distribuindo-se muitas vezes dependendo da maturidade dos frutos das plantas hospedeiras [114]. Para avaliar a capacidade de resposta em grupo, para cada estado sexual e idade foram analisadas separadamente as respostas de grupos de 5, 10 e 15 adultos machos ou fêmeas.

Sexo e Estado Sexual: A resposta a estímulos olfativos pode variar de acordo com o sexo e/ou estado sexual dos insetos já que as principais alterações fisiológicas tomam lugar durante a maturação reprodutiva e acasalamento [276]. Por esta razão foram realizados testes com machos e com fêmeas virgens ou não virgens.

Idade dos indivíduos: A idade dos insetos é com frequência um fator que influencia o comportamento. O envelhecimento pode provocar alterações no sistema sensorial dos insetos reduzindo desta forma a capacidade de resposta [114]. Para cada sexo e estado sexual (virgem, não virgem) utilizou-se separadamente adultos de 5, 8, 14 e 20 dias de idade.

Estado Nutricional: Para saber se as respostas dos insetos poderiam estar relacionadas com o tempo que os insetos tinham estado em jejum antes dos bioensaios, foram comparadas as respostas dos insetos acabados de se alimentar com proteína com as respostas dos insetos que estiveram em jejum antes dos bioensaios (1h e 24 h). Os testes foram realizados apenas com o olfatómetro sem amostra com indivíduos de oito dias de idade e em grupos de 5 indivíduos. Ao todo dos insetos acabados de se alimentar foram testados 15 por sexo (machos e fêmeas) e estado sexual (fêmeas virgens e não virgens) sendo estes números o mesmos utilizados nos bioensaios com insetos que estiveram 24 horas em jejum. Já dos insetos que estiveram em jejum 1 hora foram testados um total de 225 indivíduos de cada sexo (machos e fêmeas) e estado sexual (fêmeas virgens e não virgens).

3.3.3.4 Análise da Resposta dos Insetos aos Extratos das Plantas

Na análise da resposta dos insetos aos extratos das plantas foram utilizados um total de 675 insetos, sendo utilizados por extrato 135 insetos divididos por teste 45 machos virgens, 45 fêmeas virgens e 45 fêmeas não virgens. Em cada bioensaio foram utilizados machos virgens, fêmeas virgens e não virgens, todos com 8 dias de idades em grupos de 5 indivíduos. Tendo sido realizado um total de 120 bioensaios, sendo que em cada bioensaio a resposta do mesmo grupo de 5 insetos dentro do olfatómetro foi testada três vezes, primeiro com o olfatómetro vazio, isto é sem amostra (branco), depois com à proteína alimentar (controlo positivo) e por fim com extrato da planta. Para evitar uma possível fadiga dos insetos no espaço reduzido do olfatómetro houve entre cada teste um intervalo de 30 minutos. Nos casos em que o olfatómetro tinha amostra (proteína ou extrato de planta) foram contabilizados como *respostas positivas* os insetos que se dirigiram ao braço no qual fora colocada a amostra, como *respostas negativas* os insetos que se dirigiam ao braço sem amostra e, como *não respostas* foram contabilizados os insetos que não se deslocaram a nenhum dos braços. Em todos os bioensaios as amostras foram colocadas no braço direito. Para efeitos comparativos, nos casos em que o olfatómetro não tinha amostra, foram consideradas *respostas* sempre que os insetos se deslocaram ao braço direito e ao braço esquerdo e *não respostas* sempre que os insetos não escolheram nenhum dos braços.

No início de cada um dos bioensaios com a proteína alimentar foi preparada e utilizada 1 g de amostra. Já em cada um dos bioensaios com os extratos da planta foi preparado e utilizado cerca de 100 µl de extrato. Todos os insetos foram deixados em jejum cerca de 1 hora. Os bioensaios foram conduzidos numa sala de ambiente controlado com uma temperatura média de $22,9 \pm 1$ °C, percentagem de humidade relativa média de $46,9 \pm 4$ %, luminosidade média de 235 ± 6 lux. Após cada bioensaio o olfatómetro foi lavado e secado.

3.4 Análise Estatística

Os dados recolhidos para análise estatística foram obtidos pela observação do número de moscas que fizeram uma escolha entre um dos braços do olfatómetro ou que não responderam. Como o número de indivíduos utilizados por bioensaio foram diferentes para que se pudessem comparar os resultados os valores das respostas foram transformados em percentagens:

- **Percentagem de respostas positivas** foi obtida através da divisão do número de insetos que se dirigiram ao braço com estímulo (proteína ou extrato da planta) sobre o número total de insetos utilizados por bioensaio.
- **Percentagem de respostas negativas** foi obtida pela divisão do número de insetos que se dirigiram ao braço sem estímulo sobre o número total de insetos utilizados por bioensaio.
- **Percentagem de não respostas** foi obtida pela divisão do número de insetos que não responderam sobre o número total de insetos utilizados por bioensaio.

Os resultados foram analisados através de três testes, o modelo linear generalizado univariado (GML), do teste de Mantel-Haenszel e do teste de Wilcoxon.

O **modelo linear generalizado univariado (GML)** é uma extensão dos modelos de regressão, é utilizado para avaliar a interação entre variáveis, procurando o valor de uma variável dependente (Y) a partir de uma variável independente (X) ou preditora, pressupondo que elas assumem um modelo linear e que a variância das respostas é constante. É um teste flexível capaz de avaliar interações entre variáveis contínuas ou categóricas ou a combinação das duas [277]. Este modelo foi utilizado na análise da resposta dos insetos à proteína alimentar para verificar possíveis diferenças na resposta dos insetos através da relação entre duas ou mais variáveis. As variáveis testadas foram o número de repetições, efeitos dos braços olfatómetro, tempo de teste, sexo, estado sexual, idade e número de indivíduos por grupo. Neste estudo foi aplicado o modelo linear generalizado univariado separadamente para analisar as percentagens das respostas positivas, negativas e das não respostas.

Este modelo foi também utilizado na análise das respostas dos insetos aos extratos das plantas para verificar possíveis diferenças nas respostas dos insetos e as interações entre as variáveis sexo, estado sexual e tempo de teste. De forma semelhante ao estudo das respostas a proteína, no caso da análise das respostas aos extratos das plantas foram analisadas através deste modelo linear separadamente as percentagens das respostas positivas, negativas e não respostas.

O **teste de Mantel-Haenszel** foi aplicado para testar a independência de duas ou mais amostras cujos dados são dispostos em n tabelas de contingência 2×2 . A hipótese nula é que a resposta observada é independente do tratamento usado. Este teste foi utilizado para verificar se a resposta de

diferentes grupos de insetos à proteína alimentar dentro do olfatómetro podia ser influenciada por efeitos direcionais causados pelos braços do olfatómetro, sendo que, a amostra de proteína foi colocada umas vezes no braço direito e outras vezes no braço esquerdo, tendo-se sempre mantido as restantes condições dos bioensaios iguais, assim como as condições dos insetos (sexo, estado sexual, idade e número de indivíduos por grupo). Este teste foi utilizado com os valores das percentagens das respostas positivas separadamente das respostas negativas.

O **teste de Wilcoxon** é um teste não paramétrico utilizado para comparar duas amostras pareados ou relacionados pelas diferenças entre as suas médias. Este é uma alternativa ao teste *t de student* para dados relacionados, mas é aplicado a dados mensurados pelo menos a nível ordinal, baseia-se na magnitude das diferenças entre pares amostrais [277]. Este teste foi utilizado para verificar se havia diferenças entre o número de insetos que se deslocaram para o braço direito com o número de insetos que se deslocaram para o braço esquerdo do olfatómetro primeiro considerando apenas as respostas quando o olfatómetro não tinha amostra (branco), depois com proteína alimentar e por fim com o extrato das plantas. Este teste também foi utilizado para verificar se havia diferenças no número de insetos que responderam positivamente no olfatómetro sem amostra e com a proteína alimentar e/ ou extrato da planta.

Toda a análise estatística foi realizada através do programa IBM SPSS statistics 20.

4. RESULTADOS

4.1 Análise do Ar Com e Sem Amostra no Interior do Olfatómetro

4.1.2 Análise do Ar Sem Amostra

Para verificar se o ar que circula no interior do olfatómetro podia conter compostos voláteis contaminantes que pudessem ser posteriormente confundidos com os compostos voláteis de uma amostra, foi analisada a composição do ar do olfatómetro após lavagem do mesmo e, antes de introduzir qualquer amostra. Inicialmente, fez-se uma análise à fibra (branco da fibra) que consistiu em verificar se esta apresentava compostos retidos. Uma vez analisada a fibra, esta foi colocada no centro do olfatómetro local escolhido para a recolha dos compostos voláteis do ar. Tanto na análise do branco da fibra como da amostra de ar recolhida no interior do olfatómetro, foram encontrados 5 compostos: o dióxido de carbono, o hexametil ciclotrisiloxano, a cânfora, cis-1, o 2-dimetilciclohexano e o fenol (Tabela 12).

Tabela 12: Tempo de retenção e área dos compostos voláteis encontrados na fibra (branco da fibra) e no ar sem amostra retirado no centro do olfatómetro com as suas características químicas.

Tempo de Retenção (min)	Compostos Voláteis	Estrutura química	Massa molecular	Número CAS	Área do Pico	
					Fibra	Ar Olfatóm.
1,242	Dióxido de carbono	CO ₂	44	124-38-9	7,1x 10 ⁶	2,6x10 ⁶
2,053	Hexametil ciclotrisiloxano	C ₆ H ₁₈ O ₃ Si ₃	222	541-05-9	4,9x10 ⁵	6,6x10 ⁶
29,568	Cânfora	C ₁₀ H ₁₆ O	152	464-49-3	1,2x10 ⁶	1,1x10 ⁶
44,129	Cis-1, 2-dimetilciclohexano	C ₈ H ₁₆	112	2207-01-4	3,3x10 ⁵	3,5x10 ⁵
66,781	Fenol	C ₆ H ₆ O	94	108-95-2	1,9x10 ⁶	1,3x10 ⁶

A área dos compostos do branco da fibra e da amostra de ar recolhida no centro do olfatómetro variou muito pouco (Figura 9). No branco da fibra o composto com maior área foi o dióxido de carbono e o composto com menor área foi o cis-1,2-dimetilciclohexano. Na amostra de ar no centro do olfatómetro o composto com maior área foi hexametil ciclotrisiloxano e o composto com menor área foi o cis-1,2-dimetilciclohexano. As áreas dos compostos encontrados no branco da fibra e na amostra de ar recolhida no centro do olfatómetro diferenciaram-se apenas no caso do dióxido de carbono, que foi maior na fibra

que na amostra de ar recolhida no olfatómetro, e no hexametil ciclotrisiloxano, que foi maior na amostra de ar recolhida no olfatómetro que na fibra.

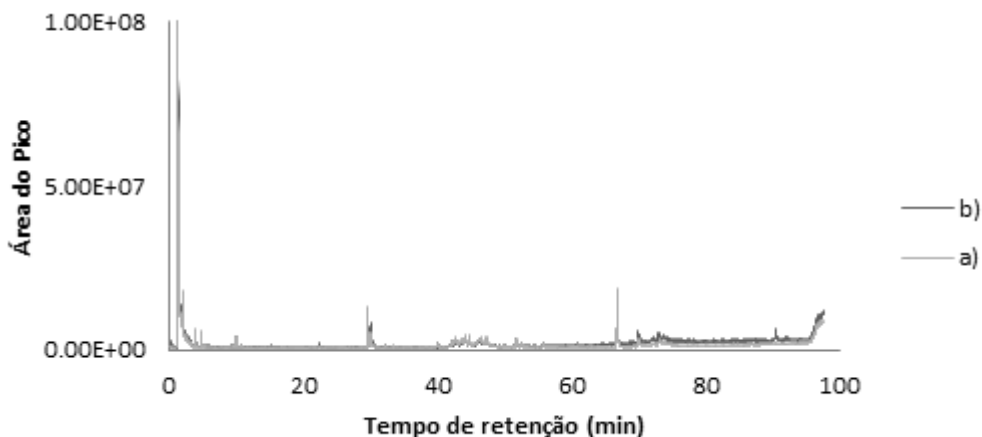


Figura 9: Cromatogramas obtidos na análise dos compostos voláteis do (a) branco da fibra e do (b) ar retirado no centro olfatómetro.

4.1.3 Análise dos Voláteis da Amostra em Vários Pontos do Olfatómetro

Para saber a possível dispersão dos voláteis no interior do olfatómetro, foi verificado se havia variação da concentração de voláteis em diferentes pontos do olfatómetro. O teste foi realizado com o trimedlure (TML) pela sua elevada capacidade de volatilização. Uma vez colocada uma amostra do TML no olfatómetro ligado foram realizadas recolhas do ar em 4 pontos diferentes. Em três dos pontos (braço com amostra, centro e base) (Figura 7II, B, A,C, D) era suposto haver voláteis e num dos pontos (braço sem amostra) (Figura 7II, B) era suposto não haver ou haver muito menos quantidade de voláteis.

Os resultados mostram que a concentração do composto varia consideravelmente ao longo do tubo do olfatómetro sendo superior no braço com amostra ($1,1 \times 10^8$) diminuindo ligeiramente cerca de 10 vezes menos no centro ($3,9 \times 10^7$) e na base ($5,5 \times 10^7$). No braço sem amostra houve aproximadamente cerca de 100 vezes menos voláteis ($3,8 \times 10^6$) que no braço com amostra. Embora tenha sido encontrado TML no braço onde não era suposto haver voláteis (Figura 6II, B), verificou-se que existem diferenças significativas na concentração deste composto entre os dois braços (teste de Wilcoxon, $p=0,046$).

4.2 Proteína

4.2.1 Análise da Composição Volátil

Para a análise da composição volátil da proteína foram recolhidas duas amostras uma na manhã (~10:00h) e na tarde (~16:00h) correspondendo aproximadamente com o início e o fim dos bioensaios. Em ambas as análises foram encontrados um total de 18 compostos voláteis. Na amostra de proteína recolhida no início do dia foram encontrados 8 pirazinas, 2 álcoois, 2 acetonas, 1 ácido, 2 aldeídos e 1 amida. Na amostra da proteína recolhida ao final do dia foram encontrados 9 pirazinas, 2 álcoois, 2 acetonas, 2 aldeídos e 1 amida (Tabela 13).

Tabela 13: Compostos voláteis da proteína alimentar FNI210 (Lallemand) Características dos obtido (a) na manhã (~10:00h) e (b) na tarde (~16:00h).

Tempo de Retenção (min)	Compostos Voláteis	Estrutura química	Massa Molecular	Número CAS	Área do Pico	
					Início do dia	Final do dia
0,920	2-amino-N-etil propanamida	C ₅ H ₁₂ N ₂ O	116	71773-95-0	1,7x10 ⁸	8,8x10 ⁷
1,480	3-metil Butanal	C ₅ H ₁₀ O	52	590-86-3	1,4x10 ⁷	1,4x10 ⁷
6,306	2-metil-pirazina	C ₅ H ₆ N ₂	94	109-08-0	9,4x10 ⁶	6,2x10 ⁶
7,786	2,5-dimetil pirazina,	C ₆ H ₈ N ₂	108	123-32-0	6,5x10 ⁷	3,8x10 ⁷
8,001	2,6-dimetil pirazina	C ₆ H ₈ N ₂	108	108-50-9	5,7x10 ⁶	4,7x10 ⁶
9,008	2,3-dimetil pirazina	C ₆ H ₈ N ₂	108	5910-89-4	-	2,6x10 ⁶
9,785	2-etil-6-metil pirazina	C ₇ H ₁₀ N ₂	122	13925-03-6	6,7x10 ⁶	4,4x10 ⁶
9,933	2-etil-5-metil pirazina	C ₇ H ₁₀ N ₂	122	13360-64-0	5,9x10 ⁶	3,5x10 ⁶
10,302	2,3,5-trimetil pirazina	C ₇ H ₁₀ N ₂	122	14667-55-1	2,2x10 ⁷	1,3x10 ⁷
11,897	2-etil-3,6-dimetil pirazina,	C ₈ H ₁₂ N ₂	136	13360-65-1	5,3x10 ⁷	3,2x10 ⁷
14,645	Benzaldeído	C ₇ H ₆ O	106	100-52-7	9,1x10 ⁶	6,1x10 ⁶
15,679	2,3-Butenodiol	C ₄ H ₁₀ O ₂	90	513-85-9	3,3x10 ⁷	3,3x10 ⁷
17,907	Butirolactona	C ₄ H ₆ O ₂	86	96-48-0	2,4x10 ⁷	1,8x10 ⁷
19,478	2,5-dimetil-3-(3-metilbutil) pirazina	C ₁₁ H ₁₈ N ₂	178	18433-98-2	3,7x10 ⁶	-
19,493	2-butil-3,5-dimetil pirazina	C ₁₀ H ₁₆ N ₂	164	50888-63-6	-	3,9x10 ⁶
24,236	Ácido Acético	C ₂ H ₄ O ₂	60	64-19-7	4,5x10 ⁶	-
27,478	Feniletanol	C ₈ H ₁₀ O	122	60-12-8	4,6x10 ⁶	2,8x10 ⁶
28,920	2-acetil pirrol	C ₆ H ₇ NO	109	1072-83-9	5,6x10 ⁶	2,8x10 ⁶

Os compostos voláteis encontrados nas duas amostras no início e no final do dia foram os mesmos à exceção de quatro. Estes quatro compostos foram o 2,5-dimetil-3-(3-metilbutil) pirazina e o ácido acético que estiveram presentes apenas na amostra recolhida no início do dia., enquanto que, o 2,3-dimetil pirazina e o 2-butil-3-5-dimetil pirazina, estiveram presentes apenas na amostra recolhida no final da tarde. Nas duas amostras, os seis compostos mais abundantes foram o 2-amino-N-etil propanamida, o 2,5-dimetil pirazina, 2-etil-3,6-dimetil pirazina, o 2,3-butenodiol, o butirolactona e o 2,3,5-trimetil pirazina. Houve ainda pequenas diferenças nas duas amostras em relação às suas áreas (Figura 10). Todos os compostos encontrados na amostra recolhida ao final do dia apresentaram áreas inferiores às áreas dos compostos encontrados no início do dia.

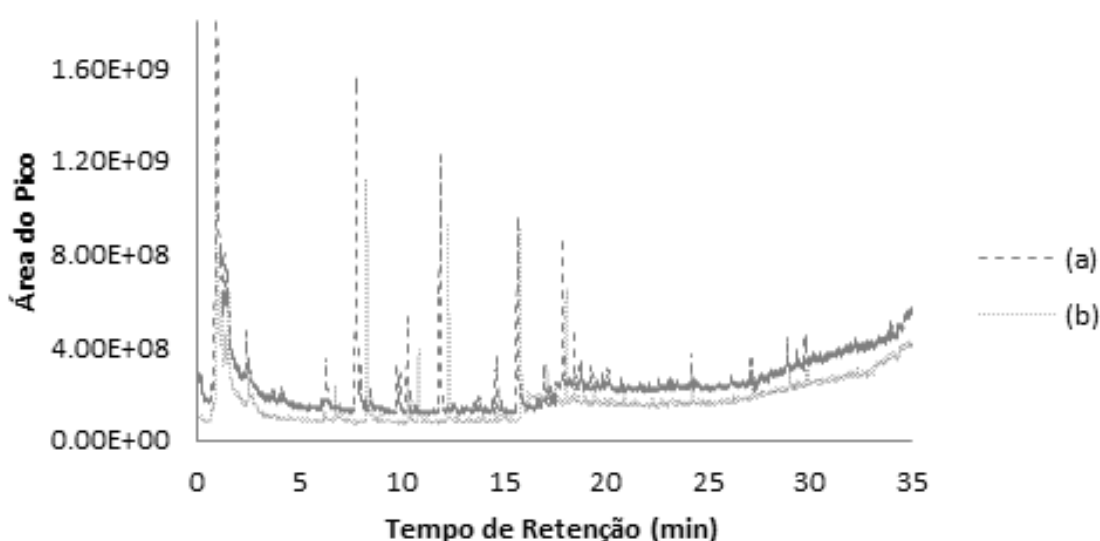


Figura 10: Cromatograma da composição volátil da proteína alimentar FNI 210 (Lallemand) obtido (a) na manhã (10:00h) e (b) na tarde (16:00h).

4.2.2 Análise das Respostas dos Insetos

O comportamento dos insetos pode ser afetado por vários fatores relacionados com os procedimentos associados ao próprio bioensaio como por exemplo, o braço no qual é colocado a amostra, o número de indivíduos utilizados, o tempo de duração do bioensaio ou ainda o número de vezes que é repetido o bioensaio com os mesmos insetos. As características fisiológicas dos indivíduos utilizados nos bioensaios também são importantes, o sexo, a idade e o estado sexual (virgem ou não) dos indivíduos podem influenciar os resultados. A partir da análise das respostas dos insetos aos compostos voláteis da proteína foi verificado o efeito das variáveis anteriormente referidas nas respostas dos insetos. As condições quer dos bioensaios quer dos insetos a partir das quais os insetos respondem melhor ao

atrativo dentro do olfatômetro foram depois escolhidas para posterior utilização nos testes com amostras de extratos de plantas. O objetivo final era poder fazer uma análise comparativa das respostas dos insetos aos voláteis das plantas e aos da proteína nas condições em que foram obtidos os melhores resultados com a proteína para ver se os extratos das plantas podem ser considerados repelentes ou atrativos.

4.2.2.1 Comparação das Respostas Obtidas nas Três Repetições

Para verificar se os mesmos indivíduos diferiam nas respostas com o tempo foi registado o número de respostas obtidas em três repetições. Cada um dos bioensaios foi repetido 3 vezes no mesmo dia com um intervalo de 30 minutos entre cada uma das repetições. As percentagens médias das respostas positivas (P), negativas (N) e das não respostas (NR) obtidas nas três repetições foram comparadas separadamente através do modelo geral linearizado univariado (GLM). Os resultados obtidos nas três repetições não diferiram significativamente nem para as respostas positivas, nem para as negativas nem para as não respostas (Tabela 14). Em conjunto os indivíduos do mesmo bioensaio responderam da mesma forma independentemente da repetição o que sugere que os insetos têm respostas consistentes que não são alteradas pelo número de vezes que ficam em contato com a amostra.

Quando analisadas separadamente as respostas positivas, verificou-se que, dependendo da idade e do número de indivíduos por grupo, as respostas nas três repetições diferiam significativamente (Tabela 12). Embora não exista uma clara relação entre a resposta positiva dos insetos com a idade e o número de indivíduos por grupo verificou-se que, independentemente do sexo, os indivíduos responderam mais na primeira repetição do que na última. No geral, os machos e as fêmeas responderam mais na primeira repetição quando tinham 5 ou 8 dias de idade e quando o número de indivíduos por grupo era de 5 (Tabela 15 e Figura 11-12).

Já as respostas negativas e as não respostas obtidas nas três repetições variaram consoante o sexo, a idade e o número de indivíduos por grupo. Em relação às respostas negativas verificou-se que os machos apresentaram maior número de respostas negativas na primeira e segunda repetição, geralmente em grupos de 10 indivíduos, enquanto as fêmeas apresentaram um número de respostas negativas maior na segunda e na terceira repetição sempre em grupos de 5 indivíduos (Tabela 13).

Tabela 14: Resultados da comparação das percentagens médias das respostas (positivas, negativas e não respostas) dos insetos à proteína alimentar após três repetições (1ª, 2ª e 3ª) do mesmo bioensaio obtidos através do modelo linear generalizado univariado (GML). As comparações foram realizadas para bioensaios com indivíduos do mesmo sexo, estado sexual, idade e mesmo número de indivíduos por grupo, independentemente do braço do olfatómetro onde foi colocada a amostra de proteína alimentar.

Interações entre Variáveis	Valor de p		
	Respostas Positivas	Respostas Negativas	Não Respostas
Repetições	n.s	n.s	n.s
Repetições*Sexo	n.s	n.s	n.s
Repetições*Estado Sexual	n.s	n.s	n.s
Repetições*Idade	n.s	n.s	n.s
Repetições*Número de indivíduos por grupo	n.s	***	n.s
Repetições*Tempo	n.s	n.s	n.s
Repetição*Sexo*Idade	n.s	n.s	***
Repetição*Sexo* Número de indivíduos por grupo	n.s	n.s	n.s
Repetição*Sexo *Tempo	n.s	n.s	n.s
Repetição*Estado Sexual*Idade	n.s	n.s	n.s
Repetições*Estado Sexual* Número de indivíduos por grupo	n.s	n.s	n.s
Repetição*Estado Sexual *Tempo	n.s	n.s	n.s
Repetição*Idade*Número de Indivíduos por grupo	***	***	n.s
Repetição*Idade*Tempo	n.s	n.s	n.s
Repetição* Número de Indivíduos por grupo*Tempo	n.s	n.s	n.s
Repetição*Sexo*Idade* Número de Indivíduos por grupo	n.s	***	***
Repetição * Sexo * Idade* Tempo	n.s	n.s	n.s
Repetição*Sexo*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	n.s	n.s	n.s
Repetição*Estado Sexual*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	n.s	n.s	n.s
Repetição*Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	n.s	n.s	n.s
Repetição*Sexo *Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	n.s	n.s	n.s
Repetição*Estado Sexual*Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	n.s	n.s	n.s

n.s. não significativa ($p > 0,05$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

O maior número de não respostas nos machos foi observado na terceira repetição, independentemente do número de indivíduos utilizados por grupo. No caso das fêmeas o maior número de não respostas foi encontrado na primeira repetição geralmente em grupos de 15 o que sugere no início não respondem e respondem menos quanto maior seja o número de fêmeas (Tabela 15). Estes resultados sugerem que para cada tipo de resposta (P, N, NR), o número de indivíduos que respondem na 1ª, 2ª ou 3ª repetição varia consoante a idade e o número de indivíduos por grupo no caso das

respostas positivas ou variam consoante o sexo, a idade e o número de indivíduos por grupo no caso das respostas negativas e não respostas.

Tabela 15: Resumo dos valores médios mais elevados das percentagens de respostas (positivas, negativas e não respostas) dos machos e fêmeas virgens (V) e não virgens (NV) à proteína alimentar obtidos em cada uma das três repetições. Os valores médios mais elevados apresentados foram calculados para bioensaios com indivíduos do mesmo sexo, estado sexual, idade e mesmo número de indivíduos por grupo.

Condições		Resposta Positiva			Resposta Negativa			Não Respostas		
		1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
♂ V	Idade (dias)	8	8	5	5	14	-	5	14	20
	N.º Indivíduos por Grupo	5	5	5	10	10	-	10	10	5
	Repetição (%)	41,1	41,1	36,7	20	20	-	80	70	77,8
♀ V	Idade (dias)	5 ou 8	8	20	-	5 ou 8	14 ou 20	20	8	-
	N.º Indivíduos por Grupo	5	5	5	-	5	5	5	15	-
	Repetição (%)	52,2	45,6	18,9	-	32,2	22,2	82,2	60	-
♀ NV	Idade (dias)	5 ou 8	14	-	5	14	20	20	8	-
	N.º Indivíduos por Grupo	5	10	5	5	5	5	15	15	-
	Repetição (%)	53,3	47,8	-	12,8	32,2	15,6	82	63,3	-

No geral a percentagem dos valores médios das respostas negativas obtidos nas três repetições, independentemente do sexo, idade, estado sexual e número de indivíduos por grupo, foram inferiores (12,8 – 32,2 %) aos valores médios das respostas positivas (16,7 – 53,3 %) e das não respostas (55,9 – 82,2 %) obtidos para as mesmas variáveis (Anexo 4 e 5). Para cada bioensaio as diferenças nas percentagens obtidas correspondem apenas a diferenças nas respostas devidas de 1 a 3 indivíduos de um total 5 indivíduos por bioensaio e de 1 a 5 indivíduos de um total de 10 ou 15 indivíduos por bioensaio. No geral para cada bioensaio as melhores respostas dos machos e fêmeas foram obtidas na primeira repetição (Tabela 13). Por este motivo, para propósitos comparativos, nas análises que se seguem foram utilizados apenas os resultados obtidos nas primeiras repetições.

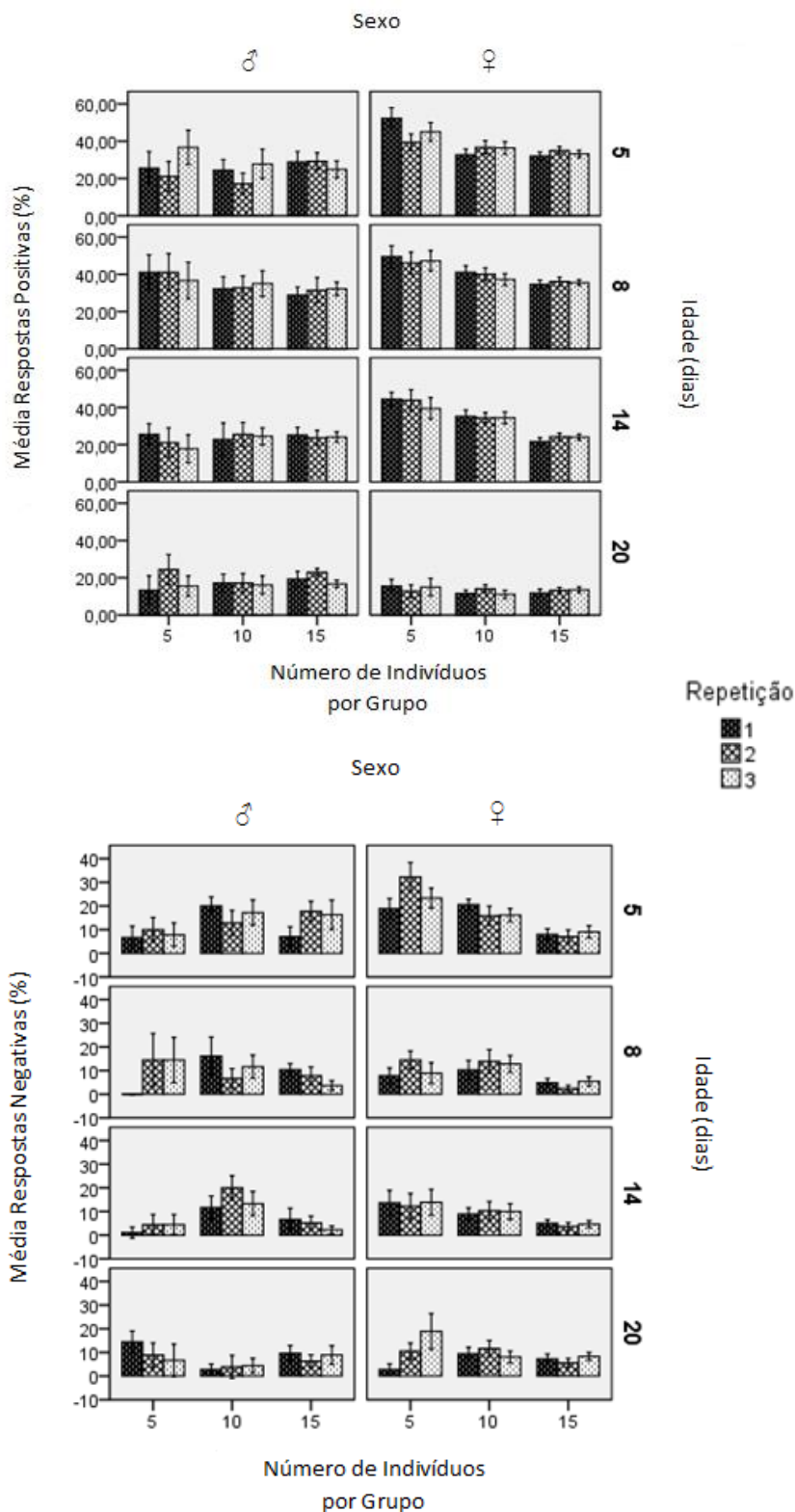


Figura 11: Comparação da média das percentagens das respostas (positivas, negativas e não respostas) dos insetos nas três repetições (1ª, 2ª e 3ª) de acordo com o sexo (machos e fêmeas), idade (5, 8, 14 e 20 dias), estado sexual (virgens e não virgens) e número de indivíduos por grupo (5, 10, 15) independentemente do braço do olfatómetro onde foi colocada a amostra. As barras representam os valores médios \pm desvio padrão das percentagens de respostas.

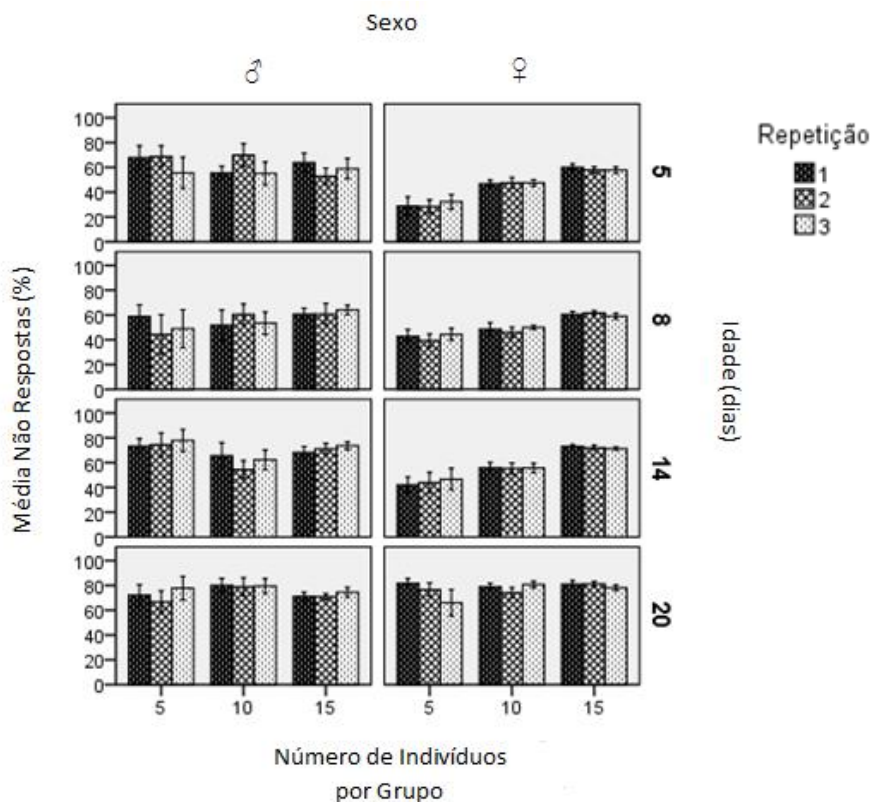


Figura 12 (continuação): Comparação da média das percentagens das respostas (positivas, negativas e não respostas) dos insetos nas três repetições (1ª, 2ª e 3ª) de acordo com o sexo (machos e fêmeas), idade (5, 8, 14 e 20 dias), estado sexual (virgens e não virgens) e número de indivíduos por grupo (5, 10, 15) independentemente do braço do olfatómetro onde foi colocada a amostra. As barras representam os valores médios \pm desvio padrão das percentagens de respostas.

4.2.2.2 Comparação das Respostas nos Dois Braços do Olfatómetro

Mesmo quando mantidas as mesmas condições dos bioensaios e dos insetos utilizados (sexo, estado sexual e idade), os insetos podem dirigir-se mais a um braço do olfatómetro do que a outro. Isto pode ser devido eventualmente à influência de factores externos (ex. maior quantidade de luz num dos braços, diferença na cor da superfície na qual se apoiam os braços). Assim, para verificar se a resposta dos insetos à proteína alimentar podia diferir entre os dois braços do olfatómetro em bioensaios com as mesmas condições, as respostas dos insetos no braço direito foram comparadas com as respostas obtidas no braço esquerdo. Para isto o olfatómetro foi rodado, de forma que o braço com a amostra passasse a estar na posição do braço sem amostra.

No global as respostas positivas e negativas dos insetos obtidas nos dois braços do olfatómetro não diferiram significativamente (Tabela 16). No entanto, quando estudadas as respostas positivas e negativas obtidas nos braços do olfatómetro separadamente consoante o sexo, estado sexual, idade e número de indivíduos por grupo através do modelo linear generalizado univariado (GML),

verificou-se que as respostas variaram significativamente. As respostas positivas obtidas nos dois braços do olfatómetro variaram de acordo com o estado sexual, a idade e o número de indivíduos por grupo. Enquanto que, nas respostas negativas os resultados dos dois braços variaram apenas de acordo com a idade e o número de indivíduos por grupo (Tabela 16).

Tabela 16: Resultados da comparação da percentagem média das respostas (positivas e negativas) à proteína alimentar observadas na primeira repetição nos dois braços do olfatómetro (direito ou esquerdo) segundo o modelo linear generalizado univariado (GML). A análise estatística foi realizada para bioensaios com indivíduos do mesmo sexo, estado sexual, idade e número de indivíduos por grupo.

Variáveis/Interações	Valor de p	
	Respostas Positivas	Respostas Negativas
Braços Olfatómetro	n.s	n.s
Braços do Olfac.*Sexo	n.s	n.s
Braços do Olfac.*Estado Sexual	n.s	n.s
Braços do Olfac.*Idade	n.s	n.s
Braços do Olfac.*Número de Indivíduos por grupo	n.s	n.s
Braços do Olfac.*Tempo	n.s	n.s
Braços do Olfac.*Sexo*Idade	*	*
Braços do Olfac.*Sexo*Número de indivíduos por grupo	*	n.s
Braços do Olfac.*Sexo*Tempo	n.s	n.s
Braços do Olfac.*Estado Sexual*Idade	n.s	**
Braços do Olfac.*Estado Sexual*Número de indivíduos por grupo	n.s	n.s
Braços do Olfac.*Estado Sexual*Tempo	n.s	n.s
Braços do Olfac.*Idade* Número de Indivíduos por grupo	n.s	**
Braços do Olfac.*Idade*Tempo	n.s	n.s
Braços do Olfac.*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	n.s	n.s
Braços do Olfac.*Sexo*Idade* Tempo	n.s	n.s
Braços do Olfac.*Sexo*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	n.s	n.s
Braços do Olfac.*Estado Sexual*Idade* Número de Indivíduos por grupo*	*	n.s
Braços do Olfac.*Estado Sexual * Número de Indivíduos por grupo*Tempo	n.s	n.s
Braços do Olfac.*Estado Sexual*Idade* Tempo	n.s	n.s
Braços do Olfac.* Idade* Número de Indivíduos por grupo*Tempo	n.s	n.s
Braços do Olfac.*Sexo*Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	n.s	n.s
Braços do Olfac.* Estado Sexual * Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	n.s	n.s

n.s. não significativas ($p > 0,05$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

Nos machos a maior diferença foi encontrada nas respostas positivas quando estes tinham 8 dias de idade e estavam em grupos de 5 indivíduos. Neste caso os machos pareciam se dirigir mais à

proteína quando esta era colocada no braço direito, sendo que nos restantes casos as respostas dos machos foram mais ou menos idênticas nos dois braços. No caso das fêmeas também se verificaram ligeiras diferenças entre as respostas obtidas no braço esquerdo e no braço direito, especialmente para as fêmeas virgens. As maiores diferenças nas respostas nos dois braços foram encontradas nos grupos de 5 indivíduos com 8, 14 e 20 dias de idade (Anexo 6 e 7). Para cada bioensaio as diferenças nas percentagens de resposta positiva e negativas obtidas correspondem apenas a diferenças nas respostas devidas de 1 a 3 indivíduos de um total 5 indivíduos por bioensaio e de 1 a 5 indivíduos de um total de 10 ou 15 indivíduos por bioensaio

Quando comparadas para o mesmo bioensaio as respostas (positivas e negativas) ao braço direito e ao braço esquerdo com o teste de Mantel-Haenszel, não foram encontradas diferenças significativas nem entre machos virgens e fêmeas virgens nem entre fêmeas virgens e fêmeas não virgens com a mesma idade e número de indivíduos por grupo (Anexo 8 e 9). Os resultados obtidos sugerem que as diferenças encontradas nos dois braços do olfatómetro não estão relacionadas com diferenças nas respostas dos indivíduos de um mesmo bioensaio, mas com as diferenças existentes entre bioensaios. As diferenças entre bioensaios deveram-se as características fisiológicas dos indivíduos utilizados (sexo, idade, estado sexual) e ao número de indivíduos por grupo.

Não havendo diferenças nos valores das respostas positivas obtidas no braço esquerdo e no braço direito do olfatómetro em cada um dos bioensaios, nas análises seguintes as respostas obtidas nos dois braços foram somadas para cada um dos bioensaios com mesmo grupo de insetos (mesmo sexo, idade e número de indivíduos). O mesmo procedimento foi adoptado para as respostas negativas.

4.2.3 Análise das Respostas Obtidas na Primeira Repetição

As percentagens médias de respostas à proteína alimentar obtidas na primeira repetição dos bioensaios foram analisadas separadamente dependendo do tipo em positivas, negativas e as não respostas (Anexo 2). Para cada tipo de respostas foram analisados os diversos factores que poderiam influencia-las, nomeadamente, o tempo de duração do teste, o sexo, o estado sexual, a idade dos insetos e ainda o número de indivíduos por grupo utilizados. Igualmente para cada bioensaio foram comparadas as respostas (positivas, negativas) e as não respostas que os mesmos insetos tinham em cada teste após os 10, 20 e 30 minutos. Cada bioensaio teve duração máxima de 30 minutos, mas as respostas dos insetos à proteína alimentar foram anotadas no fim dos 10, 20 e 30 minutos. Cada um destes factores e a interação entre os mesmos foi estudada separadamente para cada tipo de resposta através do modelo linear generalizado univariado (GML).

4.2.3.1. Análise das Respostas Positivas

a) Tempo de resposta dos insetos aos 10, 20 e 30 minutos

Através do GLM foram encontradas diferenças significativas nas respostas positivas dos insetos entre os três intervalos de tempo (Tabela 17). Verificou-se que as respostas positivas variaram significativamente consoante o sexo, idade e o número de indivíduos por grupo, mas também devido a interação destas três variáveis. Quando foram comparadas as respostas ao longo do tempo para o mesmo sexo e o estado sexual (virgens e não virgens) observou-se que, no geral, as respostas positivas aumentaram mais entre os 10 e os 20 minutos (Figura 13).

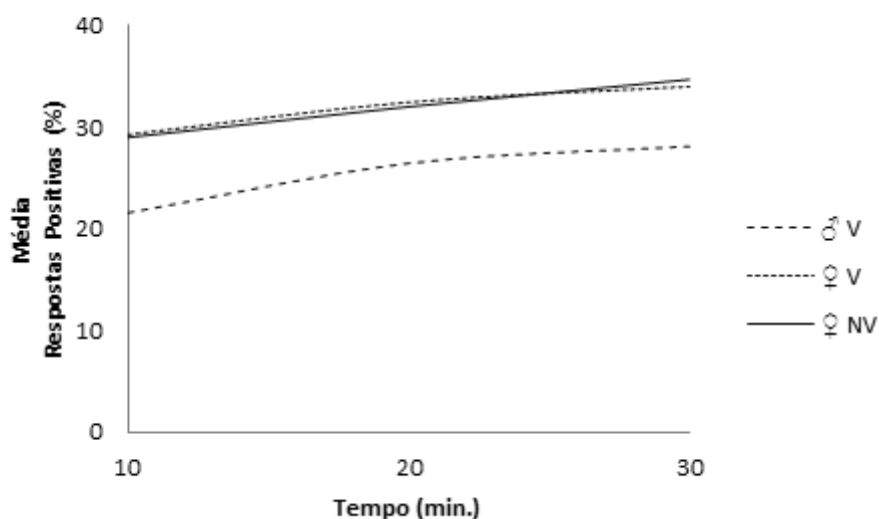


Figura 13: Valores médios das percentagens de respostas positivas obtidas na primeira repetição ao longo do tempo (10, 20, e 30 minutos) para os machos e fêmeas segundo o seu estado sexual (V=virgens e NV=não virgens) independentemente da idade e número de indivíduos por grupo.

As respostas dos machos e das fêmeas virgens foram semelhantes, aumentando de forma mais ou menos constante ao longo dos três intervalos de tempo. Independentemente da idade e número de indivíduos por grupo, a percentagem média das respostas positivas para os machos virgens aos 10, 20 e 30 minutos de teste foi respectivamente de 21,6; 26,3 e 28,1% sendo inferior a das fêmeas (virgens e não virgens). No caso das fêmeas virgens a resposta aos 10, 20 e 30 minutos (29,2; 32,6 e 33,8 % respectivamente) foi semelhante a obtida para as fêmeas não virgens (28,5; 32 e 34,8 %, respectivamente).

Tabela 17: Comparação da percentagem média das respostas (positivas, negativas e não respostas) dos insetos à proteína alimentar ao longo do tempo (10, 20 e 30 minutos) na primeira repetição através do modelo linear generalizado univariado (GML). A análise estatística foi calculada para bioensaios com indivíduos do mesmo sexo, estado sexual, idade e número de indivíduos por grupo (Anexo 10-12).

Variáveis/Interações	Valor de p		
	Respostas Positivas	Respostas Negativas	Não Respostas
Tempo	***	n.s	n.s
Tempo*Sexo	n.s	n.s	n.s
Tempo*Estado Sexual	n.s	n.s	n.s
Tempo*Idade	n.s	n.s	n.s
Tempo*Número de indivíduos por grupo	n.s	n.s	n.s
Tempo*Sexo*Idade	n.s	n.s	n.s
Tempo*Sexo* Número de indivíduos por grupo	n.s	n.s	n.s
Tempo*Estado Sexual*Idade	n.s	n.s	n.s
Tempo*Estado Sexual* Número de indivíduos por grupo	n.s	n.s	n.s
Tempo*Idade * Número de indivíduos por grupo	n.s	n.s	n.s
Tempo*Sexo*Idade * Número de indivíduos por grupo	n.s	n.s	n.s
Tempo*Estado Sexual*Idade * Número de indivíduos por grupo	n.s	n.s	n.s
Sexo	***	n.s	n.s
Sexo*Idade	***	***	n.s
Sexo*Número de indivíduos por grupo	***	***	n.s
Sexo*Idade*Número de indivíduos por grupo	***	***	***
Estado Sexual	n.s	*	n.s
Estado Sexual*Idade	n.s	***	n.s
Estado Sexual* Número de indivíduos por grupo	n.s	***	n.s
Estado Sexual*Idade*Número de indivíduos por grupo	n.s	***	n.s
Idade	***	***	***
Número de indivíduos por grupo	***	***	***
Idade* Número de indivíduos por grupo	***	***	***

n.s. não significativas ($p > 0,05$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

a) Sexo e Estado Sexual

Como o comportamento dos insetos pode mudar de acordo com sexo e/ou estado sexual (virgem e não virgem), verificou-se se existiam diferenças significativas no número de respostas positivas dos dois sexos à proteína alimentar. Para isto foram comparadas as respostas das fêmeas e machos virgens e as das fêmeas virgens e não virgens. Os resultados da análise GML mostraram que não houve diferenças significativas entre as respostas positivas das fêmeas virgens e não virgens à proteína alimentar, independentemente da idade e do número de indivíduos por grupo (Tabela 17). De fato a

percentagem média de respostas positivas das fêmeas virgens foi de 31,9 % e as das fêmeas não virgens foi 31,8 % (Figura 14 B). Isto sugere que as fêmeas independentemente de ter acasalado ou não respondem de forma semelhante ao atrativo alimentar. Pelo contrário, foram encontradas diferenças significativas entre os dois sexos, ou seja, entre às respostas dos machos e das fêmeas virgens à proteína alimentar (Figura 14 A). A percentagem média das respostas positivas dos machos virgens foi significativamente inferior (25,4 %) a das fêmeas virgens (31,9 %) (Tabela 18-19).

Tabela 18: Valores médios das percentagens de respostas (positivas, negativas) e não respostas dos machos virgens à proteína alimentar na primeira repetição. Valores obtidos de acordo com a idade (5, 8, 14 e 20 dias) e mesmo número de indivíduos por grupo (5, 10 e 15).

Idade	N.º Indivíduos por Grupo	Respostas Positivas	Respostas Negativas	Não Respostas
5	5	25,6	6,7	67,8
	10	24,4	20,0	55,6
	15	28,9	7,0	64,1
Valores médios		26,3	11,2	62,5
8	5	41,1	7,0	58,9
	10	32,2	16,1	51,7
	15	28,9	10,4	60,7
Valores médios		34,1	8,8	57,1
14	5	25,6	1,1	73,3
	10	22,8	11,7	65,6
	15	25,2	6,7	68,1
Valores médios		24,5	6,4	69,0
20	5	13,3	14,4	72,2
	10	17,2	2,8	80,0
	15	19,3	9,6	71,1
Valores médios		16,6	8,9	74,4
Valores médios		25,4	8,9	65,8

No geral, a resposta dos insetos aumentou ligeiramente até aos 8 dias de idade, sendo que, a partir daí a resposta diminuiu progressivamente com a idade (Figura 12). As fêmeas virgens e não virgens apresentaram sempre maior resposta à proteína alimentar que os machos para todas as idades menos para os 20 dias em que a media das respostas positivas dos machos foi superior.

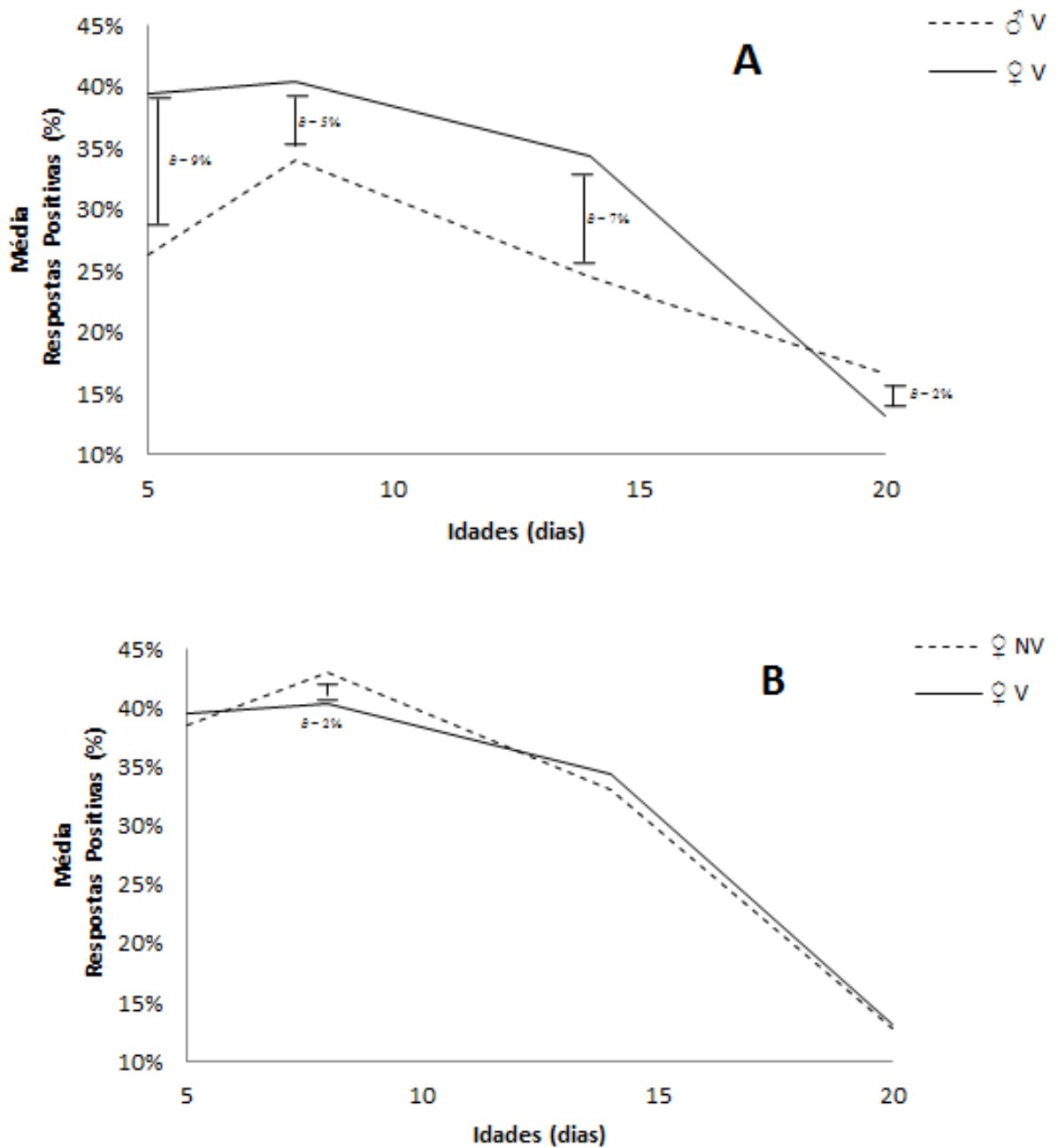


Figura 14: Percentagem média das respostas positivas obtidas na primeira repetição segundo a idade e independentemente do número de indivíduos por grupo. (A) Comparação das respostas dos machos e das fêmeas virgens (V); (B) comparação das fêmeas segundo o estado sexual (V= virgens e NV=não virgens).

a) Idade

As respostas à proteína alimentar apresentaram diferenças significativas segundo a idade dos insetos mas também devido a interações da variável idade com o sexo e número de indivíduos por grupo (Tabela 17).

No geral, as fêmeas virgens e não virgens com idades de 5, 8 e 14 dias que responderam positivamente à proteína alimentar mais do que os machos virgens para estas mesmas idades. Os machos virgens de mais idade (20 dias) respondem um pouco melhor à proteína alimentar do que as fêmeas (Figura 14-15). A média das respostas positivas aos 20 dias de idade para os machos, fêmeas virgens e não virgens foi respectivamente de 16,6, 13,2 e 12,8 %.

Tabela 19: Valores médios das percentagens de respostas (positivas, negativas e não respostas) das fêmeas virgens à proteína alimentar na primeira repetição. Valores obtidos de acordo com a idade (5, 8, 14 e 20 dias) e mesmo número de indivíduos por grupo (5, 10 e 15).

Idade	N.º Indivíduos por Grupo	Respostas Positivas	Respostas Negativas	Não Respostas
5	5	52,2	18,9	28,9
	10	33,3	21,1	45,6
	15	32,9	11,1	55,9
Valores médios		39,5	17,0	43,4
8	5	45,6	8,9	45,6
	10	40,6	10,6	48,9
	15	35,2	4,8	60,0
Valores médios		40,4	8,1	51,5
14	5	46,7	14,4	38,9
	10	36,7	6,1	57,2
	15	20,0	5,2	74,8
Valores médios		34,4	8,6	56,9
20	5	14,4	3,3	82,2
	10	12,2	9,4	78,3
	15	12,9	7,0	80,0
Valores médios		13,2	6,6	80,2
Valores médios		31,9	10,1	58,0

A maior resposta de machos virgens e fêmeas virgens e não virgens à proteína alimentar ocorreu geralmente entre os 5 e 8 dias de idade, sendo os indivíduos de 8 dias de idade os que apresentaram maior número de respostas positivas, a partir daí, com o passar dos dias a resposta começou a diminuir. Poucas diferenças foram encontradas nas respostas entre as fêmeas virgens e não virgens, no entanto, as fêmeas não virgens com 8 dias de idade foram as que responderam mais à proteína alimentar. A média das respostas positivas aos 8 dias de idade para os machos, fêmeas virgens e não virgens foi de 34,1, 40,4 e 43,0 %, respectivamente (Tabela 18-20).

a) Número de Indivíduos por Grupo

As percentagens médias das respostas positivas dos insetos dos dois sexos à proteína diferiram significativamente segundo o número de indivíduos por grupo utilizados nos bioensaios. Além destas foram encontradas também diferenças significativas resultado da interação da variável número de indivíduos por grupo (5, 10 e 15) com as variáveis sexo e idade (Tabela 17).

As fêmeas virgens e não virgens, independentemente da sua idade, apresentaram sempre melhores respostas positivas à proteína em grupos de 5 indivíduos, sendo as respostas positivas mais baixas geralmente em grupos de 15 indivíduos. A percentagem média das respostas positivas mais alta atingida pelas fêmeas virgens e não virgens em grupos de 5 foi de 52,2 e de 53,3 %, respectivamente, e as percentagens de respostas mais baixas atingidas em grupos de 15 foi de 12,2 e 10,7 %, respectivamente (Tabela 18-20).

Tabela 20: Valores médios das percentagens das respostas (positivas, negativas e não respostas) das fêmeas não virgens à proteína alimentar na primeira repetição. Valores obtidos de acordo com a idade (5, 8, 14 e 20 dias) e mesmo número de indivíduos por grupo (5, 10 e 15).

Idade	N.º Indivíduos por Grupo	Respostas Positivas	Respostas Negativas	Não Respostas
5	5	52,2	18,9	28,9
	10	32,2	20,0	47,8
	15	31,1	4,8	64,1
Valores médios		38,5	14,6	46,9
8	5	53,3	6,7	40,0
	10	41,7	10,0	48,3
	15	34,1	4,8	61,1
Valores médios		43,0	7,2	49,8
14	5	42,2	12,8	45,0
	10	33,9	11,7	54,4
	15	23,3	4,8	71,8
Valores médios		33,1	9,7	57,1
20	5	16,7	2,2	81,1
	10	11,1	9,4	79,4
	15	10,7	7,4	81,8
Valores médios		12,8	6,3	80,8
Valores médios		31,8	9,5	58,7

Os machos virgens apresentaram melhores respostas positivas à proteína em grupos de 5 indivíduos com 8 e 14 dias de idade sendo os valores médios das respostas 41,1 e 25,6 %, respectivamente. Aos 5

e os 10 dias de idade os machos apresentaram melhores respostas positivas à proteína em grupos de 15 indivíduos com médias de 28,9 e 19,2, respectivamente (Figura 15, Tabelas 18-20).

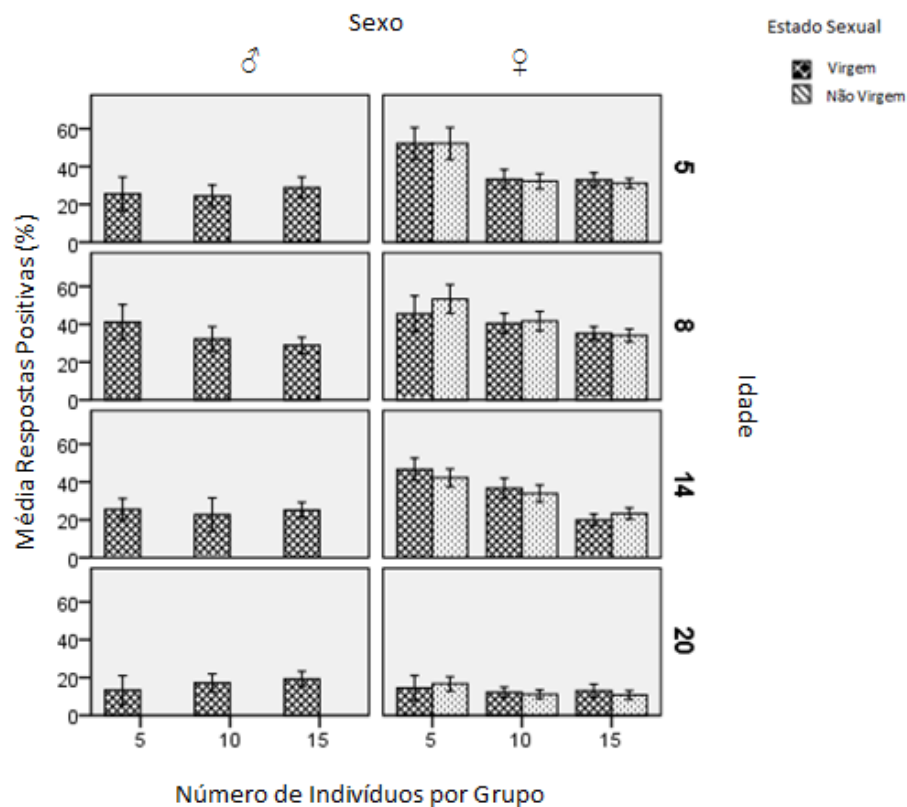


Figura 15: Valores médios das percentagens de respostas positivas obtidas na primeira repetição de acordo com o sexo (machos e fêmeas), idade (5, 8, 14 e 20 dias) e número de indivíduos por grupo (5, 10 e 15 dias). Os valores médios estão indicados nas Tabelas 16-18.

4.2.3.2 Comparação das Respostas Positivas com as Respostas Negativas

As percentagens médias das maiores e menores respostas negativas obtidas na primeira repetição para machos e fêmeas, independentemente da idade e número de indivíduos por grupo, variaram entre 1,1 e 21,1 %. As percentagens médias das respostas negativas foram mais baixas do que os valores médios obtidos nas respostas positivas que variaram entre 10,7 e 53,3 % (Tabelas 18-20). Por tanto podemos afirmar, que independentemente das condições são mais os indivíduos que se dirigem a amostra de aqueles que se dirigem ao braço sem amostra.

As maiores percentagens médias de respostas positivas e negativas nos dois sexos foram obtidos para indivíduos jovens, de 5 ou 8 dias de idade, enquanto as piores respostas nos dois casos foram

obtidas para indivíduos com mais idade (20 dias). Assim, no caso das respostas positivas, as maiores percentagens para machos e fêmeas (virgens e não virgens) foram obtidas em bioensaios com indivíduos de apenas 5 dias de idade em grupos de 10 indivíduos e as piores respostas para indivíduos de 20 dias em grupos de 5 indivíduos. Quanto as respostas negativas, os valores mais elevados foram obtidas para indivíduos de 8 dias (machos e fêmeas não virgens) e 5 dias (fêmeas virgens) em grupos de 5 indivíduos. Os valores mais baixos das respostas negativas foram obtidas sempre em indivíduos de 20 dias mas para um número de indivíduos por grupo variável (5, 10, 15) dependendo do sexo e da maturidade sexual dos indivíduos. Isto sugere que os indivíduos jovens respondem mais seja em direcção ao braço com amostra ou sem amostra mas diminuem as respostas com a idade.

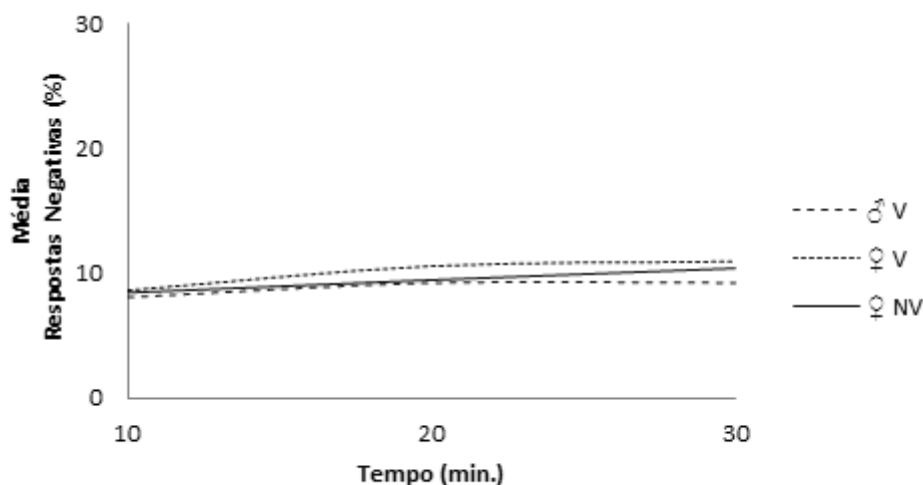


Figura 16: Valor médios das percentagens das respostas negativas à proteína obtidas na primeira repetição ao longo do tempo segundo o seu sexo e estado sexual (V=virgens e NV=não virgens), independentemente da idade, número de indivíduos por grupo.

Ao contrário do que aconteceu nas respostas positivas, as percentagens médias das respostas negativas aos 10, 20 e 30 minutos obtidas para cada um dos dois sexos (virgens e não virgens), não tiveram diferenças significativas nas respostas embora exista um ligeiro aumento com o tempo (Tabela 15). Isto sugere que, independentemente do sexo e do estado sexual, o número de insetos que não responde logo aos 10 minutos vai ser semelhante com os que não respondem aos 30 minutos, ou seja, a maioria dos indivíduos que se dirigem para o braço sem amostra fá-lo-ão logo nos primeiros minutos do bioensaio (Figura 16). A média das respostas negativas aos 10, 20 e 30 minutos de teste variou no geral entre 8 e 11% sendo semelhante nos três sexos. Para os machos virgens as respostas negativas variaram aos 10, 20 e 30 minutos 8,1; 9,2 e 9,3 % respectivamente, no caso das fêmeas virgens foi de 8,7; 10,6 e 10,9 % e nas fêmeas não virgens foi de 8,5; 9,5 e 10,4 %.

Também não foram encontradas diferenças nas percentagens médias de respostas negativas entre os dois sexos, independentemente do tempo e o estado sexual. Nos machos a percentagem média das respostas negativas obtidas foi de 9,3 %, nas fêmeas virgens foi de 12 % e nas fêmeas não virgens foi de 10 % (Tabela 15). De forma semelhante às respostas positivas, as respostas negativas são também maiores nas fêmeas, o que sugere que estas respondem mais sejam porque se dirigem ao braço com amostra seja porque se dirigem ao braço sem amostra.

Quando comparadas as respostas negativas pelo modelo GML, observou-se que há diferenças significativas consoante a idade e o número de indivíduos (Tabela 17). Os machos virgens, fêmeas virgens e não virgens com 5 dias de idade apresentaram os maiores valores médios de respostas negativas sendo 11,2, 17,0 e 14,6 %, respetivamente (Tabelas 16-18). Nos três casos verificou-se que as percentagens médias de respostas negativas diminuem com a idade. Diminuíram quase para metade dos 5 para os 8 dias mantendo-se mais ou menos igual dos 8 para os 14 dias e voltando a diminuir dos 14 para os 20 dias excepto nos machos, onde a resposta negativa aos 20 dias aumentou ligeiramente (Figura 17). Aos 20 dias de idade os machos e as fêmeas virgens e não virgens apresentam os seguintes valores médios de respostas negativas 8,9, 6,6 e 6,3 %, respetivamente (Tabelas 18-20).

O valor médio das percentagens das respostas negativas para fêmeas virgens e não virgens com 5, 8 e 20 dias de idade foi mais alto nos bioensaios em que foram utilizados grupos de 10 indivíduos e mais baixo em grupos de 15 indivíduos (Figura 18). O valor médio de respostas negativas para fêmeas virgens com 5, 8 e 14 dias de idade variou entre 6,7 e 18,9 % em grupos de 5 indivíduos sendo mais baixo em grupos de 15 que variaram entre 4,8 e 11,1 %. Estes resultados indicam que quando o número de fêmeas é elevado (15) o número de insetos que se dirigem ao braço sem amostra diminui.

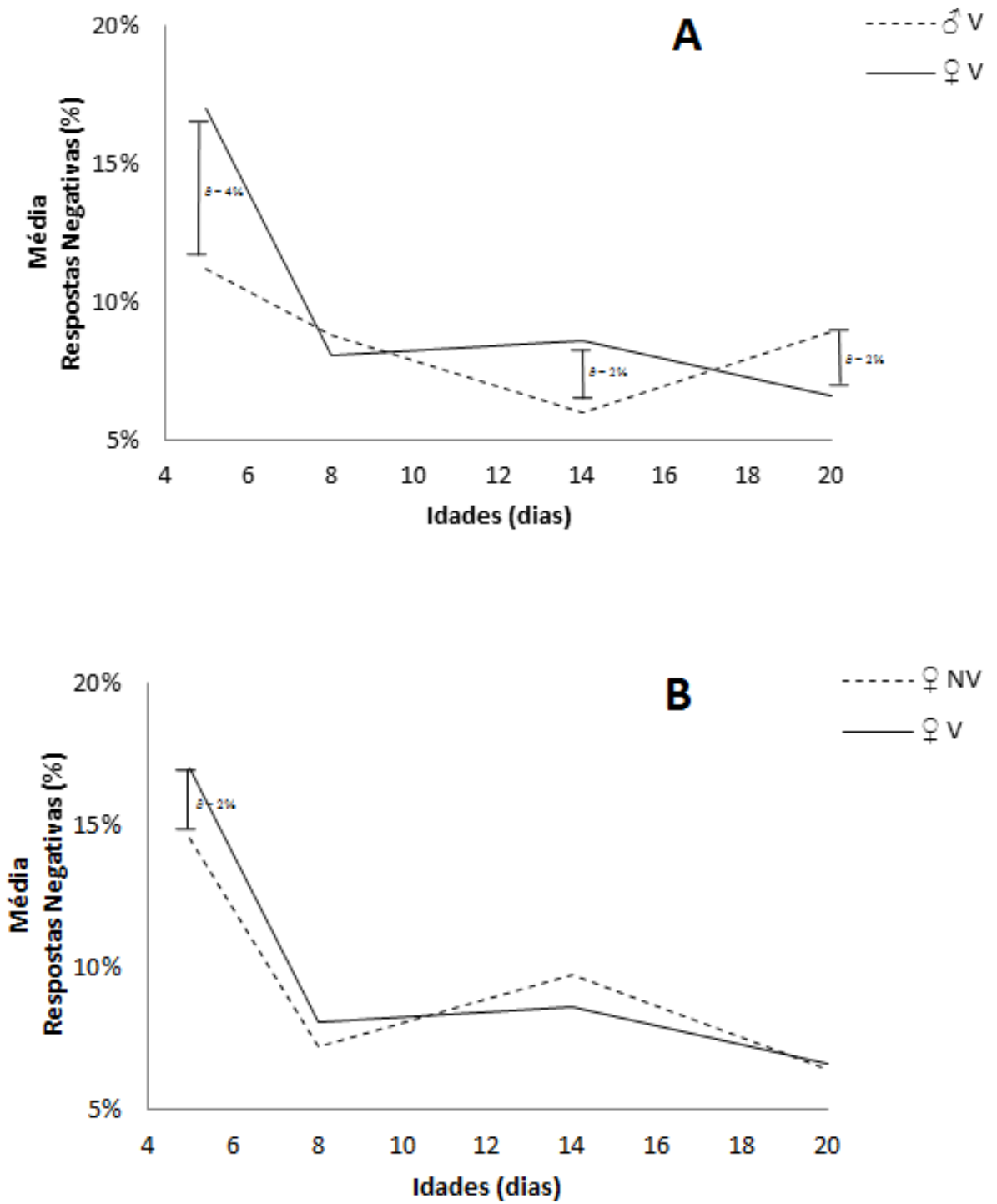


Figura 17: Percentagens médias das respostas negativas para cada idade obtidas na primeira repetição de acordo com o sexo e estado sexual (V= virgens e NV=não virgens) dos indivíduos, independentemente do número de indivíduos por grupo.

À diferença das fêmeas, os machos em grupos de 10 indivíduos dirigem-se menos para o braço do olfatómetro sem amostra. O valor médio de respostas negativas para machos virgens com 5, 8 e 14 dias de idade variou entre 11,7 e 20 % em grupos de 10 indivíduos sendo mais baixo em grupos de 15 que variaram entre 6,7 e 10,4 % (Tabela 17). Isto sugere que, embora o número de indivíduos que se dirige ao braço sem amostra aumenta quanto maior seja o grupo, este aumento não é progressivo. Nos casos dos machos parece haver um número óptimo de indivíduos que permite menores respostas ao braço sem amostra.

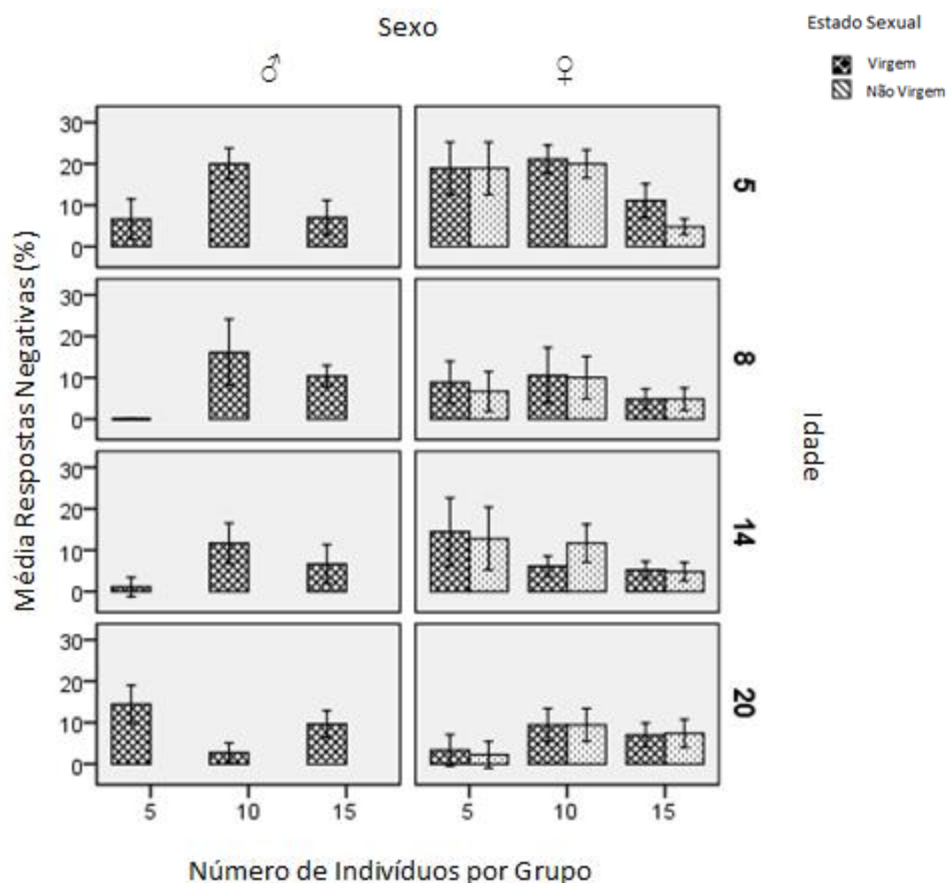


Figura 18: Valores médios da percentagem das respostas negativas dos insetos obtidas na primeira repetição segundo o sexo (machos e fêmeas), o estado sexual (virgem, não virgem), a idade (5, 8, 14 e 20 dias) e o número de indivíduos por grupo (5, 10 e 15 dias). Os valores médios estão indicados nas Tabelas 15-17.

4.2.3.3 Análise das Não Respostas

As percentagens médias da primeira repetição das não respostas dos insetos foram muito elevadas. Os valores obtidos variam entre 28,9 e 80 % sendo mais elevados do que os valores inferiores e superiores das percentagens médias das respostas positivas (10,7 e 53,3 %) e negativas (1,1 e 21,1 %).

O número de insetos que não respondeu diferiu com o tempo de duração do teste (10, 20 e 30 minutos) (Figura 18). Os indivíduos dos dois sexos (virgens e não virgens) responderam menos entre os

10 e os 20 minutos de teste. Entre os 20 aos 30 minutos de teste a não resposta diminui ligeiramente no caso de fêmeas não virgens ou manteve-se mais ou menos igual no caso de machos e fêmeas virgens. A média das não respostas aos 10, 20 e 30 minutos de teste variou entre 54 e 63%. Para os machos virgens foi de 70,5, 63,0 e 61,9 %, para as fêmeas virgens foi de 60,2, 55,5 e 54,4 % e para as fêmeas não virgens foi de 61,9, 57,7 e 55,8 %, respectivamente (Tabelas 18-20). Ao longo do tempo, os valores médios das não respostas diminuem ligeiramente, enquanto que, os valores médios das respostas negativas são semelhantes e os das respostas positivas aumentam (Figuras 13, 16, 19). Estes resultados sugerem que o número de não respostas diminui porque com o tempo parte dos indivíduos que inicialmente não respondem passam a responder positivamente, o que indica que há indivíduos que precisam mais tempo para responder que outros.

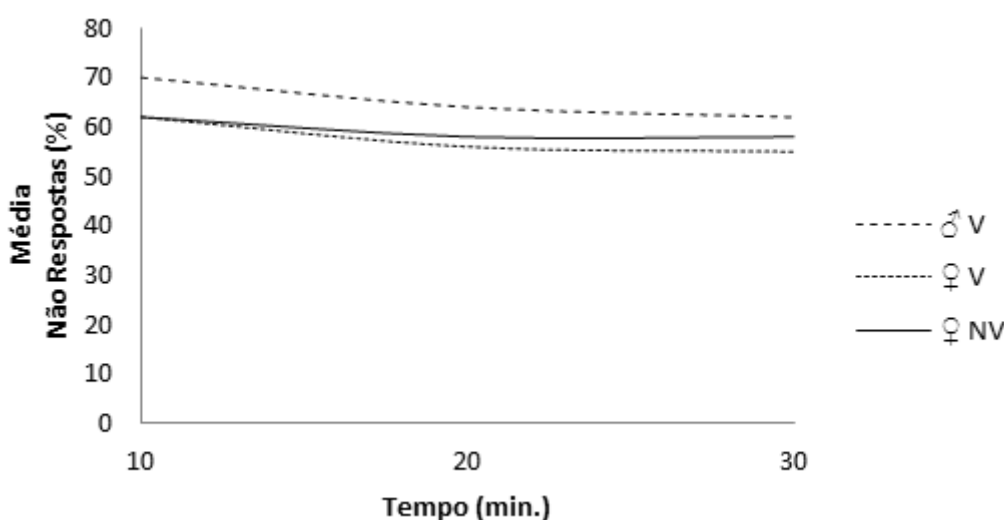


Figura 19: Valores médios da percentagem das não respostas à proteína obtidas na primeira repetição ao longo do tempo segundo o sexo e estado sexual (V=virgens e NV=não virgens), independentemente da idade e do número de indivíduos por grupo.

Não foram encontradas diferenças nos valores médios das não respostas à proteína entre fêmeas virgens (56,7 %) e não virgens (58,5%) (Figura 20). No entanto, quando comparados os valores médios das não respostas entre sexos verificou-se que no geral os machos virgens (65,1%) respondem menos do que as fêmeas virgens (56,7%). Através do modelo GML foram encontradas diferenças significativas na percentagem média das não respostas a proteína devido a idade e ao número de indivíduos por grupo. Além destas diferenças também foram encontradas diferenças significativas devida a interação destas duas variáveis entre si e as interações entre a variável sexo com as variáveis idade e número de indivíduos (Tabela 17). De acordo com os valores médios obtidos das não respostas verificou-se que os machos virgens e as fêmeas (virgens e não virgens) com 20 dias de idade, independentemente do número de indivíduos por grupo, são os que apresentam maiores valores médios de não respostas sendo

respectivamente 74,6, 76,7 e 78,6 %. Estes dados sugerem que independentemente do número de indivíduos por grupo e do sexo, com a idade os indivíduos deixam de responder (Figuras 13, 16, 19) quer positivamente quer negativamente.

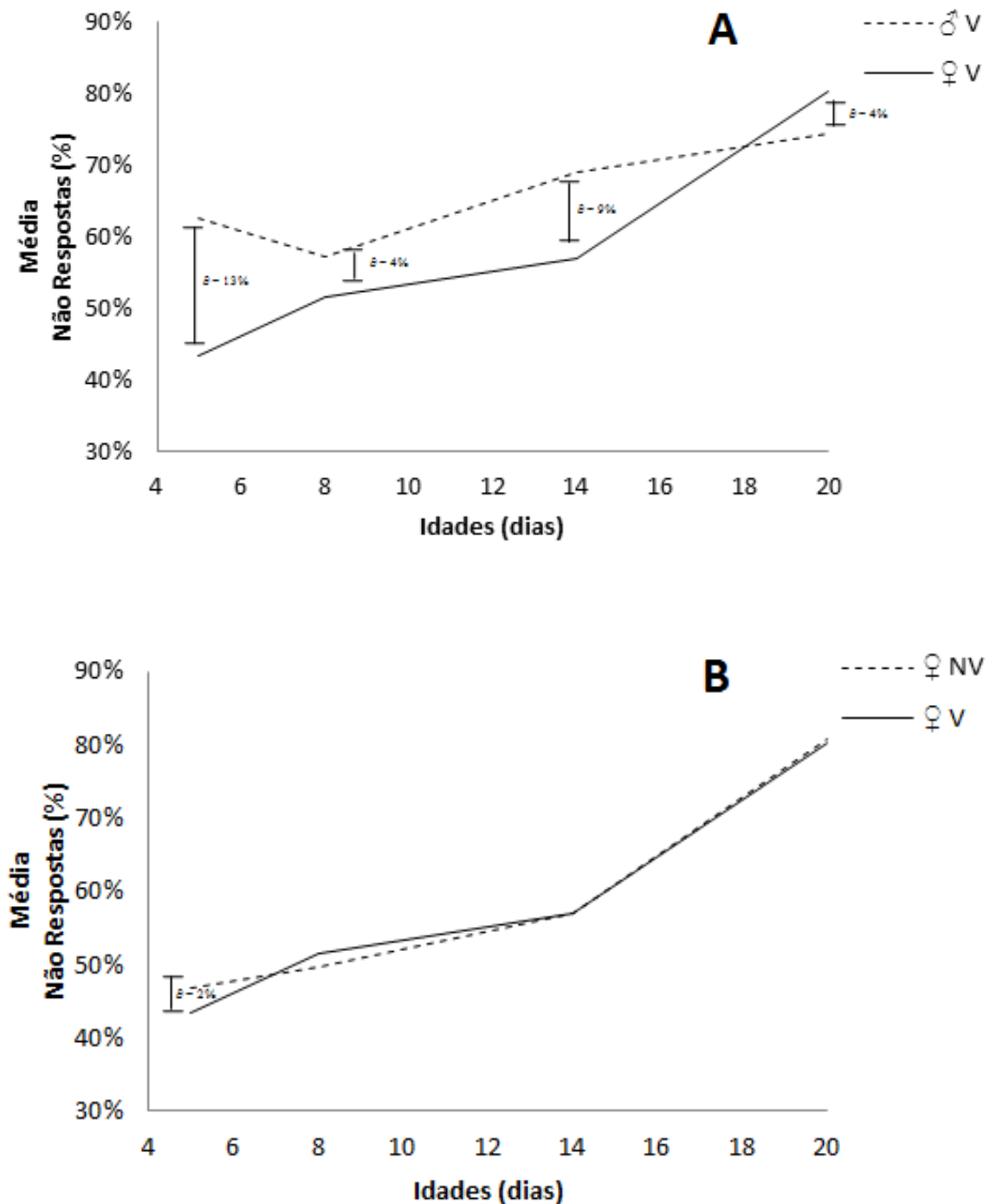


Figura 20: Percentagens médias das não respostas à proteína obtidas na primeira repetição para as varias idades (5, 8, 14, e 20 dias) de acordo com o sexo e estado sexual (V= virgens e NV=não virgens), independentemente do número de indivíduos por grupo.

O número de indivíduos por grupo também influenciou os valores médios de não resposta, sendo que independentemente da idade e do sexo, no geral, os valores de não resposta foram sempre mais baixos em grupos de 5 e sempre mais elevados em grupos de 15 (Figura 21). Os machos com 5, 8 e 14 dias de idade apresentaram menores valores médios nas não respostas em grupos de 10 indivíduos, excepto aos 20 dias, onde o menor valor foi obtido em grupos de 15 indivíduos (Tabela 15). As fêmeas virgens e não virgens com 5, 8, 14 dias de idade apresentaram valores nas não respostas semelhantes (Tabela 19-21). Os menores valores foram obtidos em grupos de 5 fêmeas, excepto aos 20 dias, onde o menor valor obtido foi para os grupos de 10 indivíduos.

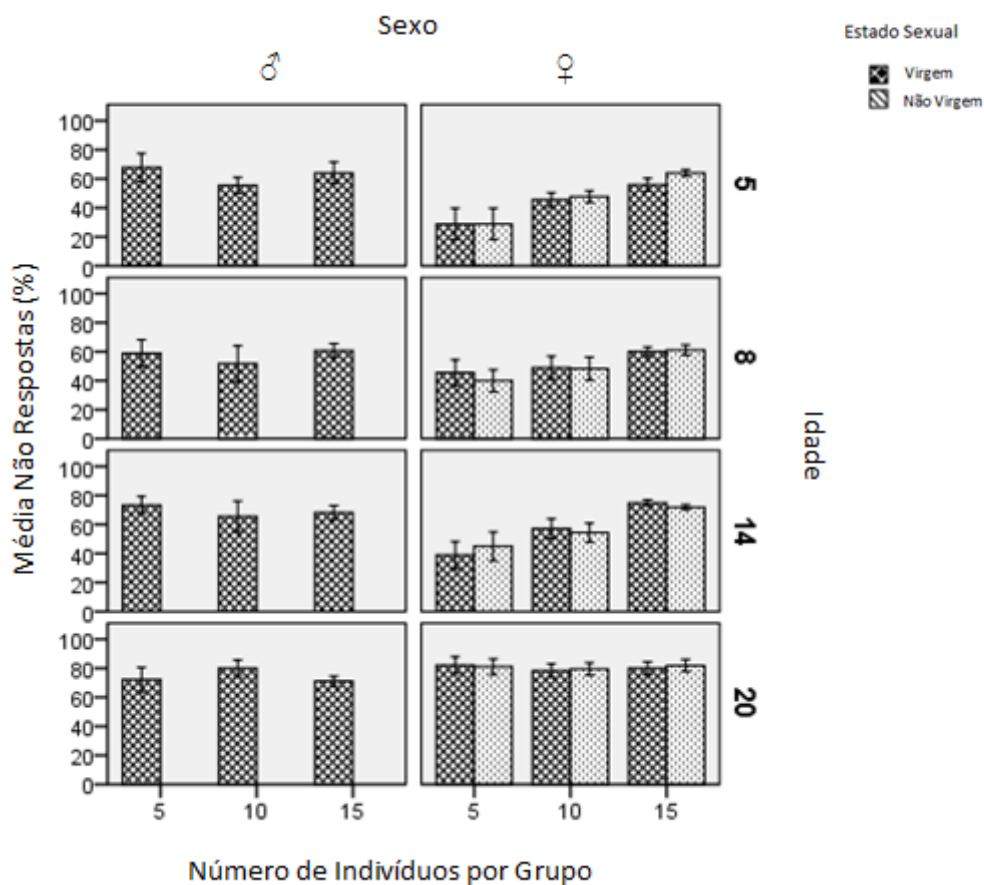


Figura 21: Valores médios das percentagens das não respostas à proteína obtidas na primeira repetição de acordo com o sexo, estado sexual (virgem, não virgem), idade (5, 8, 14 e 20 dias) e número de indivíduos por grupo (5, 10 e 15 dias). Os valores médios estão indicados na Tabela 7.

4.2.3.3 Influência do Estado Nutricional No Comportamento dos Insetos

Para saber se as respostas dos insetos poderiam estar relacionadas com o tempo que os insetos tinham estado em jejum antes dos bioensaios, foram comparadas as respostas dos insetos acabados de se alimentar com proteína com as respostas dos insetos que estiveram em jejum antes dos bioensaios (1h e 24 h). Os testes foram realizados apenas com o olfatómetro sem amostra com indivíduos de oito dias de idade e em grupos de 5 indivíduos

Os resultados mostram que o estado nutricional dos insetos influencia o comportamento dos indivíduos. Ainda que não havia amostra no olfatómetro o número global de insetos que se movimentaram em direção aos braços do olfatómetro foi superior nos insetos que estiveram em jejum 24 horas (31 – 53 %), aos que estiveram em jejum 1 hora (29 – 47 %) sendo menor nos insetos acabados de se alimentar (20 – 27 %). De acordo com isto, o maior número de insetos que não responderam foram os acabados de alimentar (73 – 80 %) e o número mais baixo foi encontrado nos insetos que estiveram em jejum 24 horas (47 – 69 %) (Tabela 21).

Tabela 21: Valores médios das percentagens de respostas obtidos nos bioensaios ao branco do olfatómetro, ao longo do tempo (10, 20 e 30 minutos) de acordo com o seu estado nutricional. Abreviaturas: V= virgens e NV= não virgens. BD= Braço Direito; BE=Braço Esquerdo. Não Resp= Não Respostas

Sexo/ Est. Sex.	Tempo	Acabados de Alimentar			1 hora em jejum			24 horas em jejum		
		BD	BE	Não Resp	BD	BE	Não Resp	BD	BE	Não Resp
♂♂ V	10	7%	13%	80%	14%	8.5%	77.5%	13%	13%	73%
	20	7%	13%	80%	17.5%	10%	72.5%	13%	20%	67%
	30	7%	13%	80%	18.5%	11.5%	70%	13%	20%	67%
		7%	13%	80%	14%	10%	70%	13%	18%	69%
♀♀ V	10	20%	0%	80%	22.5%	22%	55.5%	33%	20%	53%
	20	20%	7%	73%	23.5%	24%	53%	33%	13%	47%
	30	20%	13%	67%	24.5%	25%	51%	33%	13%	40%
		20%	7%	73%	24%	23%	53%	33%	16%	47%
♀♀ NV	10	20%	7%	73%	13%	14%	73%	20%	20%	60%
	20	20%	7%	73%	14%	16%	70%	27%	13%	60%
	30	20%	7%	73%	16.5%	16.5%	68.5%	27%	13%	60%
		20%	7%	73%	15%	16%	71%	24%	16%	60%

Nos insetos acabados de alimentar verificou-se que as fêmeas (7 - 20 %) responderam no geral mais do que os machos (7 – 13 %). Resultados semelhantes foram encontrados nos insetos que estiveram 1 hora em jejum e 24 horas em jejum (Tabela 21). As respostas das fêmeas virgens e não virgens foram semelhantes apenas quando os insetos estavam acabados de se alimentar mas quando estavam em jejum as fêmeas virgens responderam mais que as não virgens. Nas fêmeas que levavam 1 hora em jejum 23 a 24 % das fêmeas virgens responderam e só apenas 15 a 16 % das não virgens

responderam. Das fêmeas que estiveram 24 horas em jejum responderam o 16 a 33 % das fêmeas virgens e 16 a 24 % das não virgens.

No geral, o número de insetos que se dirigiram ao braço direito foi semelhante aos que se dirigiram ao braço esquerdo embora com umas ligeiras diferenças (Tabela 21). Estas respostas mantiveram-se ao longo do tempo nos dois braços nos insetos acabados de alimentar mas nos insetos que estiveram em jejum verificou-se uma ligeira variação nas respostas dos dois braços.

4.3 Plantas

4.3.1 Análise da Composição Volátil

4.3.1.1 Composição Volátil dos Extratos Recolhidos das Folhas das Plantas

Nos extratos recolhidos das folhas das cinco plantas analisadas neste estudo foram encontrados um total de 93 compostos voláteis (Figura 22-23, Tabela 22). No extrato das folhas do *E. globulus* foram encontrados 36 compostos, seguindo-se em menor número de compostos o *L. novocanariensis* (32), a *R. chalepensis* (29), o *C. canariensis* (28) e por último o *M. communis* (22).

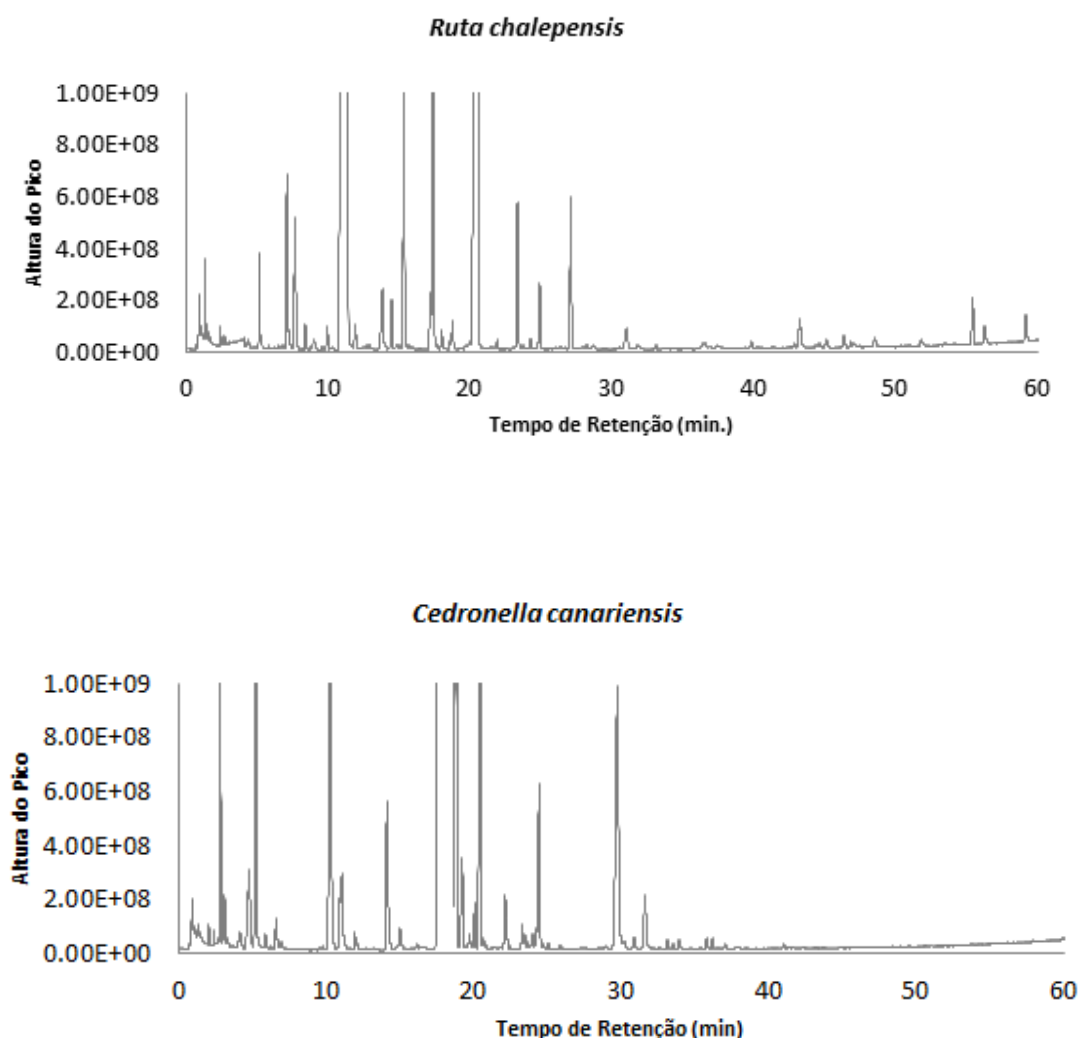


Figura 22: Cromatogramas da composição volátil dos extratos recolhidos das folhas das plantas obtidos por GC-qMs.

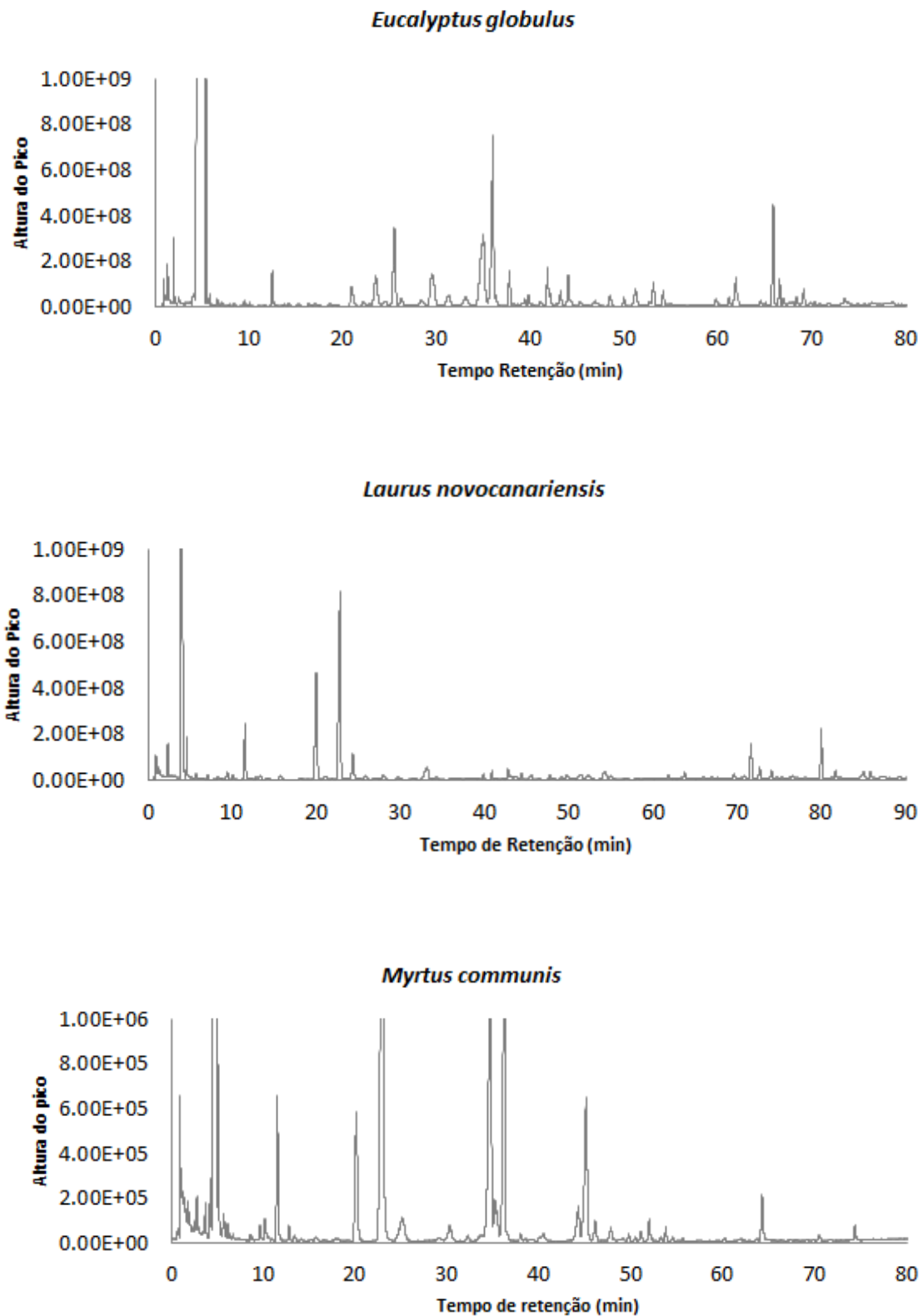


Figura 23 (continuação): Cromatogramas da composição volátil dos extratos recolhidos das folhas das plantas obtidos por GC-qMs.

Tabela 22: Compostos voláteis maioritários encontrados nos extratos das folhas das cinco espécies plantas estudadas obtidos por GC-qMs. Estão indicados em cada caso o nome do composto, o índice de Kovacs (IK), o número CAS, a área do composto obtido no extrato da planta (A_A), a área relativa do composto calculado com base nas cinco espécies de plantas (A_{RP}) e compostos voláteis conhecidos por estimular resposta atrativa para *C. capitata*(^{*}).

IK	Composto	Número Cas	<i>Ruta chapeolens</i>		<i>Cedronella canariensis</i>		<i>Eucalyptus globulus</i>		<i>Laurus novacanariensis</i>		<i>Myrtus communis</i>	
			A _A	A _{RP}	A _A	A _{RP}	A _A	A _{RP}	A _A	A _{RP}	A _A	A _{RP}
900	Acetato de etilo*	141-78-6	1.5x10 ⁷	100 %			1.1x10 ⁷	71.4 %				
916	2- Etil furano	3208-16-0	9.1x10 ⁵	100 %					2.9x10 ⁵	31.8 %		
935	2,4-Dimetil-3-pentanona	565-80-0									3.8x10 ⁶	100 %
943	α-Pineno*	7785-70-8			1x10 ⁶	6.4%	1.6x10 ⁷	100 %			1.5x10 ⁶	9.3%
948	α-Tujeno	2867-05-02			6x10 ⁵	100 %						
970	Tujeno	28634-89-1							1.9x10 ⁵	100 %		
973	Hexanal*	66-25-1	1.6x10 ⁶	22.2%			3.1x10 ⁶	42.8%	7.1x10 ⁶	100 %	4.7x10 ⁶	66.2 %
981	β-Pineno	127-91-3			5.1x10 ⁷	100 %						
991	Sabineno	3387-41-5			1.4x10 ⁷	100 %						
1001	3-Hexen-2-ona	763-93-9					4x10 ⁵	100 %				
1004	α-Felandreno*	99-83-2									1.5x10 ⁶	100 %
1009	β-Mirceno	123-35-3									1x10 ⁷	100 %
1022	Limoneno*	138-86-3	1.1x10 ⁶	4.8 %			4.41E+06	18.9 %			2.34E+07	100 %
1027	2-Heptanona*	110-43-0	2.6x10 ⁶	100 %								
1037	γ-Trepeno*	99-85-4							5.6x10 ⁵	100 %		
1040	1,8-Cineol (eucaliptol)*	470-82-6			3.5x10 ⁷	1.4 %	2.5 x10 ⁹	100 %	2.5 x10 ⁸	10 %	1.8x10 ⁹	74.2 %
1045	Trans-2-hexanal*	6728-26-3									4.6x10 ⁷	100 %
1048	2-Hexanal*	505-57-7	1.8 x10 ⁷	19.2 %	9.5x10 ⁷	100 %	3.8x10 ⁷	40.1 %	1.1x10 ⁷	11.6 %		
1055	3-Metil-1-butanol*	123-51-3					3.8x10 ⁷	100 %				
1058	α-Terpineno*	99-86-5					2.5 x10 ⁶	100 %	1.6 x10 ⁶	64.4 %		
1059	3-Careno*	13466-78-9	8.6 x10 ⁵	100 %					1.2 x10 ⁵	13.8 %		
1063	Cis-o-cimeno	3338-55-4									4 x10 ⁶	100 %
1072	m-Cimeno	535-77-3			7.7 x10 ⁶	100 %			2.3 x10 ⁶	29.5 %		
1072	o-Cimeno*	527-84-4					1.9 x10 ⁶	100 %				
1077	Terpinoleno*	586-62-9			6.3x10 ⁵	100 %	2.9 x10 ⁵	46.2%				
1078	α-Careno	554-61-0			1.6 x10 ⁵	100 %						
1080	2-Octanona*	111-13-7	4.4 x10 ⁷	100 %								
1088	3-metil-3,4-dietilciclohexeno	61141-77-3	4.3 x10 ⁷	100 %								
1107	Acetato cis-3-hexenil*	3681-71-8	6.2 x10 ⁶	100 %			5 x10 ⁵	8.1 %	1 x10 ⁶	16.5 %		
1098	3-Metilbutil pentanoato	01-09-2050					8.8 x10 ⁵	100 %				
1110	Metimazol	60-56-0	4.1x10 ⁶	100 %								
1121	3,3,6-Trimetil-1,5-heptadien-4-ona	546-49-6							4.5 x10 ⁶	65.6 %	6.9 x10 ⁶	100 %
1122	4-Metileno-5-hexanal	17844-21-2					1.2 x10 ⁶	100 %				
1126	Cis-2-penten-1-ol*	1576-95-0					6 x10 ⁵	100 %				
1140	Hexanol*	111-27-3	6x10 ⁶	73%			4.7 x10 ⁵	5.7 %	2.4 x10 ⁶	28.8 %	8.2x10 ⁶	100 %
1157	2-Nonanona*	821-55-6	1.8 x10 ⁷	100 %	8.8 x10 ⁶	0.5 %						
1164	Cis-3-hexenol*	928-96-1			4 x10 ⁶	5.6 %	1.48E+07	20.8 %	2.8 x10 ⁷	39.7%	7.1 x10 ⁷	100 %
1181	Trans-2-Hexenol*	928-94-9	7.6 x10 ⁶	100 %	2.9 x10 ⁶	38.6 %	8.2 x10 ⁵	10.8 %	1.5 x10 ⁶	20.2%	5.5 x10 ⁶	72.8 %
1207	1-Octen-3-ol	3391-86-4			5.1 x10 ⁷	100 %						
1214	1-Noneno	124-11-8	1.3 x10 ⁷	100 %								
1224	Metil fenil éter	3558-60-9			7 x10 ⁶	100 %						
1231	2-Decanona	693-54-9	7.8 x10 ⁷	100 %								
1262	Benzaldeído*	100-52-7	6.1 x10 ⁵	68.3 %	9 x10 ⁵	100 %	5.3x10 ⁵	58.6%	8.4 x10 ⁵	93.3 %		
1263	2-Nonanol	628-99-9	1.4 x10 ⁷	100 %								
1272	4-Acetil-1-metil ciclohexeno	70286-20-3							7,8x10 ⁷	100%		
1276	2-Undecanona	112-12-9	8.6x10 ⁸	100 %								
1295	β-cariofileno*	87-44-5			2.9 x10 ⁷	100 %						
1295	Pinocarvona	30460-92-5	9.9 x10 ⁷	1.9 %	5.3 x10 ⁹	100 %	1.6 x10 ⁷	0.3 %			1.1 x10 ⁸	2 %
1310	Linalol*	78-70-6	6.9 x10 ⁵	0.1 %	1.9 x10 ⁸	38.2 %			1.4 x10 ⁸	27.2%	5 x10 ⁷	100 %
1315	Mirtenal	564-94-3			1.4 x10 ⁸	100 %						
1318	2-Undecanona	112-12-9	8.6 x10 ⁸	100 %								
1343	Trans-pinocarveol	547-61-5			1.8x10 ⁷	43.1 %	4.2 x10 ⁸	100 %				
1350	4-Terpinenol	562-74-3			9.5 x10 ⁶	16.5 %	5.7 x10 ⁷	100 %			3.7 x10 ⁷	63.8 %

Tabela 23 (continuação): Compostos voláteis maioritários encontrados nos extratos das folhas das cinco espécies plantas estudadas obtidos por GC-qMs. Estão indicados em cada caso o nome do composto, o índice de Kovacs (IK), o número CAS, a área do composto obtido no extrato da planta (A_A), a área relativa do composto calculado com base nas cinco espécies de plantas (A_{RP}) e compostos voláteis conhecidos por estimular resposta atrativa para *C. capitata*(*).

IK	Composto	Número Cas	<i>Ruta chapeolens</i>		<i>Cedronella canariensis</i>		<i>Eucalyptus globulus</i>		<i>Laurus novocanariensis</i>		<i>Myrtus communis</i>	
			A_A	A_{RP}	A_A	A_{RP}	A_A	A_{RP}	A_A	A_{RP}	A_A	A_{RP}
1362	2-Dodecanona	6175-49-1	4 x10 ⁷	100 %								
1364	Cis-citral	106-26-3			1.6 x10 ⁶	100 %						
1375	Isoborneol	124-76-5			3.0 x10 ⁶	100 %						
1376	α -Terpinol*	98-55-5	2.1 x10 ⁶	0.8 %	3.6 x10 ⁷	14.3%	1.1 x10 ⁸	41.7 %	3.2 x10 ⁶	1.3 %	2.5x10 ⁸	100 %
1376	4-Carvomentenol	562-74-3							1.8 x10 ⁷	100 %		
1379	Fenchol	1632-73-1					3.8 x10 ⁶	100 %				
1385	2-Dodecanona	6175-49-1	1.9 x10 ⁷	100 %								
1387	Carvona	2244-16-8			9.8 x10 ⁵	100 %						
1393	4-Terpineol	562-74-3					5,7x10 ⁷	100 %				
1397	Cis-2-nonen-4-ine	56392-46-2							3.2 x10 ⁶	100 %		
1398	Citral	5392-40-5			7.3 x10 ⁵	100 %						
1419	Metil saliciato	119-36-8	4.5 x10 ⁷	100 %								
1432	2-Tridecanona	593-08-8	1.1x10 ⁶	100 %								
1439	p-Menta-3-8-diol	42822-86-6					5.6 x10 ⁶	100 %				
1457	Trans-pinocarveol	547-61-5							4,2 x10 ⁷	100 %		
1481	2-Tridecanona	593-08-8	9.9 x10 ⁶	100 %								
1489	Anetol	104-46-1			2 x10 ⁷	100 %			3.00E+06	14.7%		
1498	Mirtenol*	515-00-4			1.6 x10 ⁸	41.8%			5.5 x10 ⁵	0.2 %	3.2 x10 ⁸	100 %
1544	Acetato de α -terpenil	80-26-2									2.5 x10 ⁷	100 %
1564	2-Fenil acetoneitrilo	140-29-4	3.2 x10 ⁶	100 %								
1589	Trans-citral	141-27-4					7.4 x10 ⁷	100 %				
1615	3,6,6-trimetil-2-ciclohexenol	73741-62-5					4.8 x10 ⁶	100 %				
1634	2,6-Dimetil-1,5,7-Octatrieno-3-ol	29414-56-0							4 x10 ⁶	100 %		
1638	1,5-Cis-9-Aromadendreno	85048-01-7					2.4 x10 ⁵	100 %				
1673	Cis-3-Hexenil butirato	16491-36-4							1.3 x10 ⁶	100 %		
1676	Acetato de etil-2-fenil	101-97-3					9.9 x10 ⁶	100 %				
1774	Cis-carveol	1197-06-4					7.5 x10 ⁶	100 %				
1780	p-cimen-8-ol	1197-01-9					4.7 x10 ⁷	100 %	2.2 x10 ⁵	4.7 %		
1824	Citrol	624-15-7					1.3 x10 ⁷	100 %				
1841	Estragole	140-67-0									9.7 x10 ⁸	100 %
1875	Geraniol	106-24-1									5.8 x10 ⁶	100 %
1881	Álcool feniletilo*	60-12-8					7.4 x10 ⁶	100 %				
1883	Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6							6.5 x10 ⁶	100 %		
2129	Epiglobulol	489-41-8					2.1 x10 ⁷	100 %				
2178	Metil Eugenol*	93-15-2							2.8 x10 ⁶	9.9 %	2.8 x10 ⁷	100 %
2212	Ledol	577-27-5					5.1 x10 ⁷	100 %				
2214	Viridiflorol	552-02-3							1.2 x10 ⁶	100 %		
2250	Nerolidol	7212-44-4							1.1 x10 ⁶	100 %		
2293	Cis- α -copaeno-8-ol*	58569-25-8							3.3 x10 ⁶	100 %		
2303	Spatoledol	650-60-3							1.6 x10 ⁶	100 %		

Os compostos encontrados nos extratos das plantas foram agrupados, de acordo com a sua família química. Estas famílias incluem os álcoois, acetonas, aldeídos, éteres, ésteres, hidrocarbonetos, monoterpenos oxigenados (M.O), monoterpenos (M.H), sesquiterpenos oxigenados (S.O) e os sesquiterpenos (S.H). Os compostos voláteis da família dos furanos e outros compostos com átomos de

enxofre e azoto na sua composição por terem uma percentagem muito baixa foram agrupados num único grupo denominado de “Outros” (Tabela 24).

A exceção da *R. chalepensis*, nos extratos das cinco espécies plantas a família química com maior área obtida por GC-qMs foi a dos monoterpenos oxigenados. Este grupo nas quatro espécies de plantas esteve representado por áreas que variaram entre 68,3 e 93,5 %. No caso da *R. chalepensis* a maior área (85.7%) correspondeu a família das acetonas.

Tabela 24: Famílias químicas principais às quais pertencem os compostos voláteis obtidos da análise dos extratos recolhidos das folhas das plantas. Na categoria *outros* foram incluídos os compostos de azoto, enxofre e furanos. Os valores indicados correspondem à percentagem das áreas obtidas por GC-qMs de cada um dos compostos obtidos em cada extrato de planta.

Família Química	% Área relativa				
	<i>Ruta chalepensis</i>	<i>Cedronella canariensis</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Laurus novocanariensis</i>	<i>Myrtus communis</i>
Monoterpenos Oxigenados	6,4	93,5	87,1	68,3	86,8
Monoterpenos	0,1	3,2	3,8	0,7	1,1
Sesquiterpenos Oxigenados	-	-	2,2	2,7	-
Sesquiterpenos	-	0,5	1,2	-	-
Álcoois	1,1	0,9	2,2	5,6	2,4
Acetonas	85,7	0,1	0,2	13,2	3,4
Aldeídos	1,0	1,5	1,4	3,2	1,5
Éteres	-	0,1	0,2	3,8	-
Ésteres	2,1	-	1,1	1,2	4,8
Hidrocarbonetos	2,8	-	0,4	1,2	-
Outros	0,8	0,1	-	0,1	-

No extrato da *C. canariensis* foram encontrados compostos pertencentes a 7 das 11 famílias químicas principais, sendo que, a de maior área correspondeu à família dos monoterpenos oxigenados com 93,5 % da área, onde a pinocavona (84,1%) e o mirtenal (2,17%) foram os compostos com maior área. As restantes famílias apresentaram uma percentagem de área inferior a 4 %. Assim por ordem de importância da percentagem de área seguiram-se os monoterpenos (3,2 %), aldeídos (1,5 %), álcoois (0,9 %), sesquiterpenos (0,5 %), acetonas (0,1 %), éteres (0,1 %) e o grupo de “Outros” compostos (0,1 %).

No extrato de *E. globulus* foram identificados compostos voláteis de 10 das 11 famílias químicas estabelecidas e tal como no caso anterior, a maior percentagem de área correspondeu à família dos monoterpenos oxigenados com 87,1 % do total da área obtida para a *E. globulus*. Os compostos maioritários desta família no extrato de *E. globulus* foram o 1,8-cineol (77,4), α -terpineol (3,3 %). As restantes famílias químicas representam áreas percentuais inferiores a 4%. Seguiram-se, com valores muito inferiores, a família química dos monoterpenos (3,8 %), sesquiterpenos oxigenados (2,2 %), álcoois

(2,2 %), aldeídos (1,4 %), sesquiterpenos (1,2 %), ésteres (1,1 %), hidrocarbonetos (0,4 %), éteres (0,2 %) e as acetonas (0,2 %).

No extrato de *L. novocanariensis* foram encontradas 9 famílias químicas, sendo que a maior percentagem de área correspondeu à família dos monoterpenos oxigenados com 68,3 % da área. Os compostos maioritários encontrados pertencentes à primeira família foram 1,8-cineol (36,9%) e linalol (20,4%). Neste extrato a família das acetonas também se destacou com uma área de 13,2% com o composto maioritário o 4-acetil-1-metil ciclohexeno (11,7 %). As restantes famílias tiveram uma área inferior a 6 %. Assim por ordem de importância seguiram-se os álcoois (5,6 %), éteres (3,8 %), aldeídos (3,2 %), sesquiterpenos oxigenados (2,7 %), hidrocarbonetos (1,2 %), ésteres (1,2 %), monoterpenos (0,7 %), e os “Outros” compostos (0,1 %).

No extrato da *R. chalepensis* foram identificadas compostos voláteis pertencentes a 7 famílias químicas. Neste extrato, ao contrário das espécies anteriores, a família química com maior percentagem de área encontrada foi a das acetonas com 85,7 % da área total. Os compostos maioritários encontrados neste extrato foram 2-undecanona (52,5 %) e o 2-nonanona (24,1 %). As restantes famílias tiveram uma área inferior a 7 %. Assim por ordem de importância seguiram-se os monoterpenos oxigenados (6,4 %), hidrocarbonetos (2,8 %) ésteres (2,05 %), álcoois (1,1 %), aldeídos (1,0 %), outros (0,8 %) e os monoterpenos (0,1 %).

No extrato de *M. communis* foram identificados compostos voláteis pertencentes a apenas 6 famílias químicas das 11 famílias identificadas nas plantas analisadas. Também neste extrato a família química com maior percentagem de área foi a dos monoterpenos oxigenados com 86,8 %, onde o 1,8-cineol (53,1%), linalol (14,4%) são os compostos com maior área. As restantes famílias químicas apresentaram áreas inferiores a 5%. Assim por ordem de importância seguiram-se os ésteres (4,8 %), as acetonas (3,4 %), os álcoois (2,4 %), aldeídos (1,5 %) e os monoterpenos (1,1 %). Apesar da família dos monoterpenos oxigenados ter uma área maior em 4 das 5 espécies de plantas, os compostos maioritários desta família não foram os mesmos nas quatro espécies.

4.3.1.2 Compostos Voláteis Encontrados nas Plantas que Estimulam uma Resposta Atrativa em *C. capitata*

De acordo com a bibliografia, cerca de 30 dos compostos voláteis totais encontrados nas cinco espécies de plantas analisadas neste trabalho são conhecidos por serem atrativos de *C. capitata* (Tabela 19), muitos deles são comuns nas cinco plantas estudadas. A presença destes compostos nas plantas estudadas variou em cerca de 30 a 56 % (Figura 24). A planta com maior percentagem destes compostos foi encontrada no *M. communis* (56 %), seguiu-se uma planta endémica da Macaronésia, a *C. canariensis* (39,4 %), *E. globulus* (32,1 %), a *R. chalepensis* (30,1 %) e por último o *L. novocanariensis* (29,8 %).

Estes compostos pertencem maioritariamente às famílias dos álcoois, aldeídos, acetonas, ésteres, monoterpenos oxigenados e monoterpenos (Figura 24). De todos os compostos voláteis que estimulam uma resposta atrativa aqueles maioritários encontrados nos extratos de *L. novocanariensis*, *C. canariensis* e *M. communis* pertencem à família dos monoterpenos oxigenados, enquanto que os compostos encontrados no extrato de *R. chalepensis* pertencem à família das acetonas e os do extrato de *E. glóbulos* pertencem à família dos álcoois.

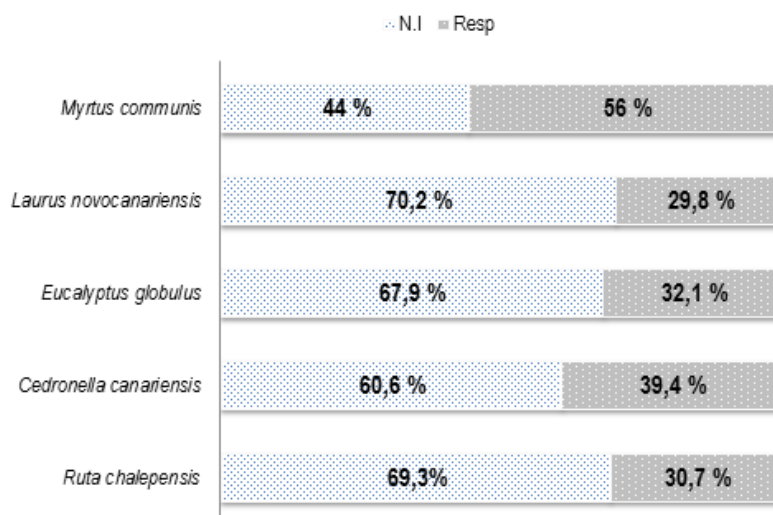


Figura 24: Percentagem de compostos voláteis obtidos nos extratos das cinco espécies plantas estudadas conhecidos por serem atrativos de *C. capitata* (ver compostos na Tabela 19). N.I.: N.º de compostos voláteis onde a resposta de *C. capitata* não é conhecida; Resp. : N.º de compostos voláteis conhecidos por exercer resposta atrativa para *C. capitata*.

Da família química dos álcoois foram encontrados quatro compostos que estimulam uma resposta atrativa em *C. capitata*: o trans-2-hexenol, o cis-3-hexenol, o hexenol e o álcool feniletílico. Apenas 1 desses 4 compostos, o trans-2-hexenol esteve presente em todos os extratos. O cis-3-hexenol e o hexenol foram encontrados em 4 dos extratos excepto em *R. chalepensis* e em *C. canariensis*, respetivamente. O álcool fenilo etílico foi encontrado apenas nos extratos de *R. chalepensis* e *E. globulus* (Figura 25, Tabela 22-23).

Da família química dos aldeídos foram encontrados dois compostos comuns: o benzaldeído e o 2-hexanal. Estes compostos estiveram presentes em todos os extratos à exceção do *M. communis*. Da família química das acetonas foi encontrado apenas um composto comum, o 2-nonanona. Este composto foi encontrado apenas nos extratos de *R. chalepensis* e *C. canariensis*. Da família química dos ésteres foram encontrados dois compostos: o acetato de cis-3-hexenil e o acetato de etilo. O primeiro dos compostos foi encontrado em 3 extratos das cinco espécies de plantas excepto em *C. canariensis* e *M. communis*. O segundo composto foi encontrado apenas nos extratos de *R. chalepensis* e *E. globulus* (Tabela 22-23).

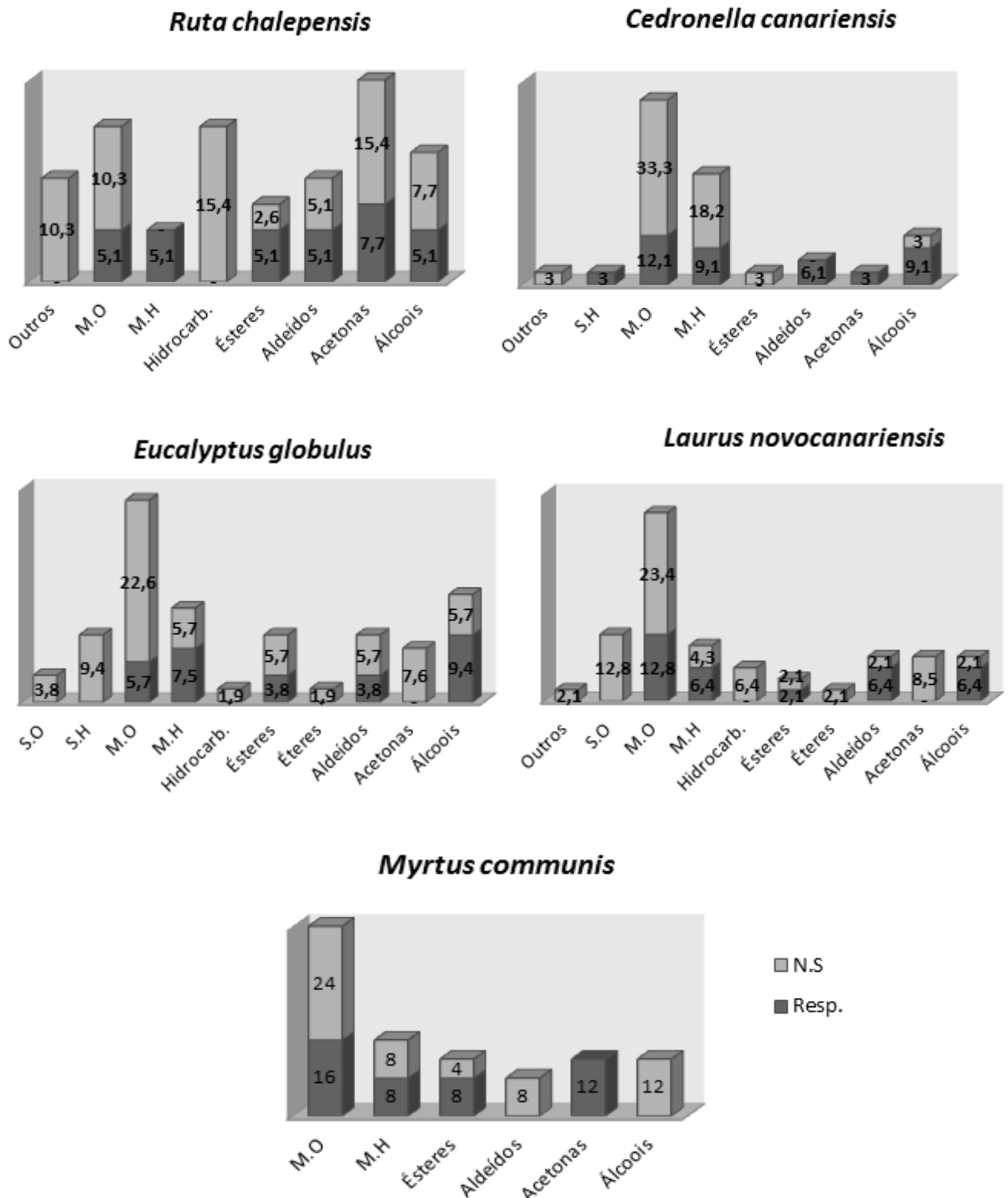


Figura 25: Para cada família química é indicada a percentagem de compostos voláteis presentes nos extratos das cinco espécies de plantas estudadas conhecidos por estimular uma resposta atrativa em *C. capitata*. N.S.: Percentagem de compostos voláteis para os quais a resposta de *C. capitata* não é conhecida; Resp.: Percentagem de compostos voláteis conhecidos por exercer resposta atrativa para *C. capitata*.

Da família química dos monoterpenos oxigenados foram encontrados quatro compostos comuns: o α -terpineol, o linalol, o eucaliptol e o mirtenol. O α -terpineol foi encontrado nos extratos das cinco espécies de plantas. O linalol e o eucaliptol foram encontrados em quatro espécies de plantas. O linalol não foi encontrado no *E. globulus* e o eucaliptol não foi encontrado na *R. chalepensis*. Por último o mirtenol foi encontrado em três dos extratos nomeadamente em *C. canariensis*, *L. novocanariensis* e *M. communis*. Da família química dos monoterpenos foram encontrados quatro compostos em comum: o limoneno presente em extratos de três espécies *R. chalepensis*, *E. globulus* e *M. communis*; o 3-careno presente nos extratos de *R. chalepensis* e *L. novocanariensis*, o α -terpineno presente nos extratos de *E. globulus* e *L. novocanariensis* e o γ -terpineno presente apenas no extrato de *L. novocanariensis*.

Quando em cada extrato de planta somou-se a área dos compostos que estimulam uma resposta atrativa na mosca independentemente da sua família química e comparou-se com a soma da área dos restantes compostos encontrados no extrato verificou-se que à exceção de em *C. canariensis* as áreas dos compostos atrativos foram superiores às áreas dos restantes compostos (Figura 26). A maior da área de compostos atrativos foi encontrada em *M. communis* (94,6 %) e *E. globulus* (85,3 %). Seguiu-se *L. novocanariensis* (69,3 %) e *R. chalepensis* (59,6 %) sendo a *C. canariensis* (9,4 %) a espécie que teve uma área de compostos voláteis atrativos muito inferior às restantes plantas investigadas.

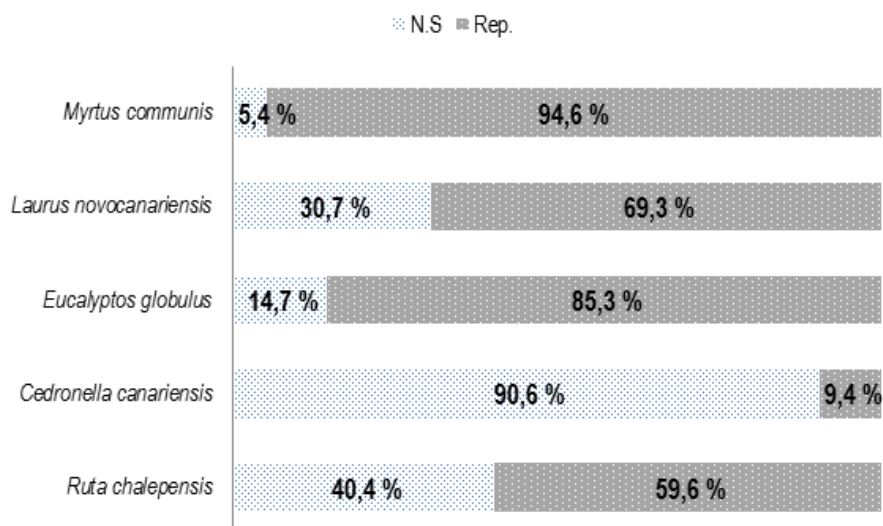


Figura 26: Percentagem das áreas dos compostos voláteis que estimulam uma resposta atrativa na mosca da fruta para cada uma das cinco espécies de plantas. N.S.: Área dos total de compostos voláteis onde a resposta de *C. capitata* não é conhecida; Resp.: Área do total de compostos voláteis atrativos para *C. capitata*.

4.3.1.3 Odores dos compostos voláteis

Cada composto volátil pode ter um ou vários odores característicos. Os voláteis encontrados nos extratos das plantas apresentam, de acordo com a bibliografia, cerca de 43 odores diferentes [278, 279].

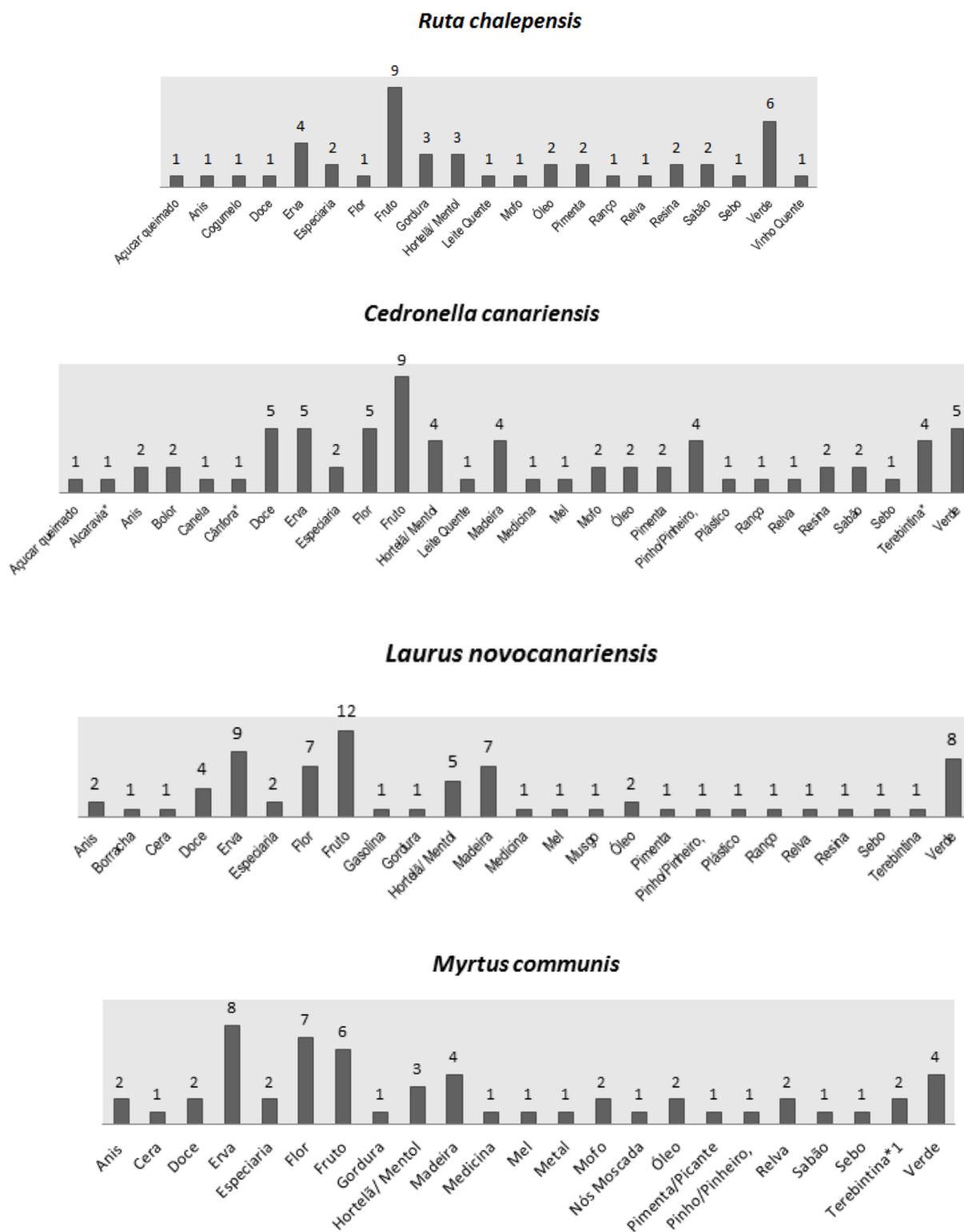


Figura 27: Número de compostos voláteis obtidos nos extratos das folhas das cinco espécies de plantas agrupados segundo a odor de acordo com os dados publicados.*Alcaravia: planta; Cânfora: planta; Terebintina: líquido obtido por destilação da resina de coníferas (diluente).

Os extratos das diferentes plantas variaram quanto ao tipo de odores encontrados mas a maioria dos odores foi comum nos diferentes extratos (Figura 27). Por ordem decrescente as plantas que tiveram

compostos com odores mais diferenciados foram *E. globulus* (36), *C. canariensis* (28), *L. novacanariensis* (25), *M. communis* (23) e *R. chalepensis* (21).

Os compostos que pertencem à família química dos monoterpenos (oxigenados e hidrocarbonetos) apresentam geralmente odores a doce, flores, fruta, hortelã/mentol e pinho/pinheiro. Dps odores frutados foram identificados maioritariamente compostos com odor a citrinos, como laranjas e limões, e em menor quantidade também foram encontrados compostos com odores a pêssigo, banana e noz. Os compostos que pertencem à família química dos aldeídos, acetonas, esteres e álcoois apresentam geralmente odores a erva, verde e gordura. Nos extratos de *C. canariensis*, *R. chalepensis*, *L. novacanariensis*, *E. globulus* o odor fruto foi o que apresentou maior número de compostos variando entre 8 a 12, seguindo-se o odor a erva (4-9) e a verde (6-8), com exceção no caso do *M. communis* onde o odor com maior número de compostos encontrados foi o odor a erva (8), seguindo-se os de odor a flor (7), odor a fruto (6).

4.3.2 Análise da Resposta dos Insetos nos Bioensaios das Cinco Espécies das Plantas

Para conhecer a resposta dos insetos aos voláteis das cinco espécies de plantas foram realizados os bioensaios nas condições que deram melhores resultados nos testes de resposta à proteína Alimentar (Anexo 3).

4.3.2.1 Olfatómetro Sem Amostra

Comparação das Respostas

O comportamento dos insetos quando o olfatómetro não tem amostra (branco) foi estudado nos bioensaios realizados para as cinco espécies de plantas. Quando não foi colocada amostra a maior parte dos indivíduos não respondeu. Contudo, apesar de não haver qualquer composto químico, em todos os bioensaios alguns indivíduos dirigiram-se a um dos dois braços, ou seja, responderam (Figura 28). Tanto os machos como as fêmeas de diferente estado sexual responderam quando não havia amostra variando a percentagem média de respostas entre 21,7 e 57,5 %. As percentagens médias de respostas (ao braço direito e ao braço esquerdo), obtidas nos cinco bioensaios foram semelhantes observando-se a maior variação no *R. chalepensis* (21,7 – 57,5 %) e a menor nos de *M. communis* (22,3 – 35 %) (Tabela 25). Ao igual que nos bioensaios da proteína, isto sugere que sempre houve um número considerável de indivíduos (entre 22 e 58 %) que respondeu mesmo quando não havia amostra.

Comparação das Respostas para Diferente Sexo e Estado Sexual

As fêmeas virgens foram as que responderam mais (35 – 57,5 %), seguindo-se as fêmeas não virgens (21,7 – 40 %) e os machos virgens (22,5 – 29,2 %), excepto no bioensaio de *R. chalepensis* onde ai os machos virgens (32,5 %) responderam mais do que as fêmeas não virgens (21,7 %) (Tabela 2). As fêmeas virgens tal como os machos virgens apresentaram maior resposta no bioensaio de *R. chalepensis* (57,5 % vs 32,5 %) e menor no bioensaio de *M. communis* (35 % vs 22,5 %). A maior percentagem média de respostas nas fêmeas não virgens foi encontrada no bioensaio de *L. novacanariensis* (40 %) e a menor no bioensaio com *R. chalepensis* (21,7 %) (Tabela 25).

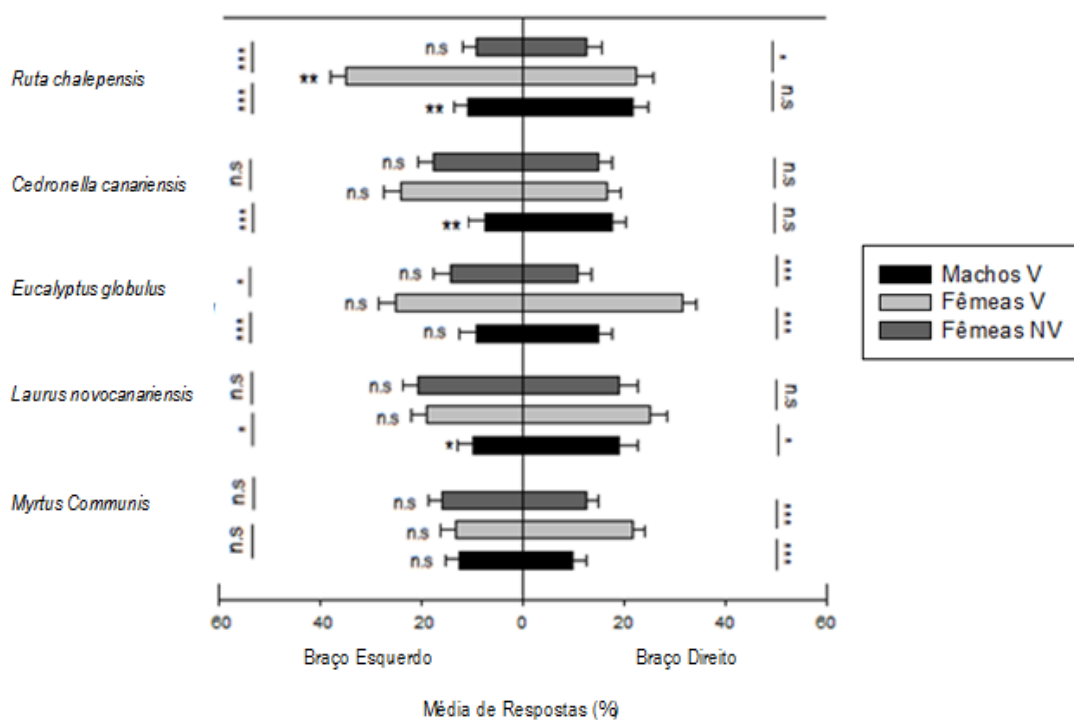


Figura 28: Percentagem média de respostas dos insetos dos dois sexos (virgens e não virgens) ao braço direito e ao braço esquerdo olfatómetro sem amostra obtidos nos bioensaios das 5 espécies de plantas. Aos insetos foi dada a hipótese de escolherem entre um dos dois braços do olfatómetro. As barras representam as médias das percentagens de resposta nos dois braços \pm o desvio padrão. Os símbolos ao lado das barras representam as diferenças entre as percentagens de decisão dos insetos que se deslocam entre o braço direito e o braço esquerdo determinado pelo teste Wilcoxon para os indivíduos do mesmo sexo e estado sexual em cada um dos bioensaios das plantas. Os símbolos no lado direito, fora das barras, representam as diferenças nas respostas obtidas no braço direito entre indivíduos de sexos diferentes e mesmo estado sexual (machos virgens e fêmeas virgens) ou entre indivíduos do mesmo sexo e diferente estado sexual (fêmeas virgens e fêmeas não virgens). Os símbolos no lado esquerdo, fora das barras, representam as diferenças entre as respostas obtidas no braço esquerdo entre indivíduos de sexos diferentes e mesmo estado sexual (machos virgens e fêmeas virgens) ou entre indivíduos do mesmo sexo e diferente estado sexual (fêmeas virgens e fêmeas não virgens). Os valores das duas margens laterais foram determinadas pelo GML. Abreviaturas n.s. ($p > 0,05$) não significativa; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 25: Valores médios das percentagens de respostas com os mesmos insetos obtidos nos bioensaios ao branco do olfatómetro, proteína alimentar e extrato da planta ao longo do tempo (10, 20 e 30 minutos). Abreviaturas: V= virgens e NV= não virgens. RP= resposta positiva; RN= resposta negativa.

Bioensaios	Sexo	Estado Sexual	Tempo	Branco			Proteína			Extrato		
				RP	RN	Não Resp	RP	RN	Não Resp	RP	RN	Não Resp
<i>R. chalepensis</i>	♂	V	10	20	10	70	30	7.5	62.5	25	7.5	67.5
			20	22.5	10	67.5	40	15	45	25	7.5	67.5
			30	22.5	12.5	65	42	15	43	27.5	7.5	65
			Valores Médios	21.7	10.8	67.5	37.5	12.5	50	25.8	7.5	66.7
	♀	V	10	22.5	35	42.5	42.5	20	37.5	32.5	25	42.5
			20	22.5	35	42.5	50	15	35	40	27.5	32.5
			30	22.5	35	42.5	52.5	12.5	35	37.5	27.5	35
			Valores Médios	22.5	35	42.5	48.3	15.8	35.9	36.7	26.7	36.6
	♀	NV	10	12.5	10	77.5	35	12.5	52.5	15	27.5	57.5
			20	12.5	10	77.5	35	12.5	52.5	17	32.5	50.5
			30	12.5	7.5	80	32.5	12.5	55	20	32.5	47.5
			Valores Médios	12.5	9.2	78.3	34.2	16.7	49.1	17.5	30.8	51.7
<i>C. canariensis</i>	♂	V	10	17.5	7.5	75	42.5	5	52.5	40	12.5	47.5
			20	17.5	7.5	75	50	2.5	47.5	42.5	12.5	45
			30	17.5	7.5	75	50	2.5	47.5	42.5	12.5	45
			Valores Médios	17.5	7.5	75	47.5	3.3	49.2	41.7	12.5	45.8
	♀	V	10	12.5	20	67.5	37.5	15	47.5	30	27.5	42.5
			20	15	25	60	52.5	17.5	30	32.5	30	37.5
			30	22.5	27.5	50	52.5	17.5	30	32.5	30	37.5
			Valores Médios	16.7	24.2	59.1	47.5	16.7	35.8	31.7	29.2	39.1
	♀	NV	10	15	17.5	67.5	35	5	60	27.5	15	57.5
			20	15	17.5	67.5	40	5	55	30	15	55
			30	15	17.5	67.5	42.5	5	52.5	30	15	55
			Valores Médios	15	17.5	67.5	39.2	5	55.8	29.2	15	55.8
<i>E. globulus</i>	♂	V	10	7.5	7.5	85	40	10	50	17.5	5	77.5
			20	17.5	7.5	75	45	10	45	20	7.5	72.5
			30	20	12.5	67.5	45	17.5	37.5	25	7.5	67.5
			Valores Médios	15	9.2	75.8	39.2	12.5	48.3	20.8	6.7	72.5
	♀	V	10	30	25	45	47.5	17.5	35	40	12.5	47.5
			20	32.5	25	42.5	57.5	17.5	25	50	15	35
			30	32.5	25	42.5	60	17.5	22.5	50	15	35
			Valores Médios	31.7	25	43.3	53.3	17.5	29.2	46.7	14.2	39.1
	♀	NV	10	10	12.5	77.5	30	5	65	27.5	12.5	60
			20	10	12.5	77.5	47.5	5	47.5	27.5	20	52.5
			30	12.5	17.5	70	55	2.5	42.5	27.5	20	52.5
			Valores Médios	10.8	14.2	75	50	4.2	45.8	27.5	17.5	55
<i>L. novocanariensis</i>	♂	V	10	15	5	80	35	15	50	32.5	2.5	65
			20	20	12.5	67.5	40	20	40	47.5	7.5	45
			30	22.5	12.5	65	40	20	40	47.5	7.5	45
			Valores Médios	19.2	10	70.8	38.3	18.3	43.4	42.5	5.8	51.7
	♀	V	10	25	17.5	57.5	47.5	17.5	35	22.5	20	57.5
			20	25	20	55	52	12.5	35.5	37.5	25	37.5
			30	25	20	55	55	10	35	37.5	27.5	35
			Valores Médios	25	19.2	55.8	51.7	13.3	35	32.5	24.2	43.3
	♀	NV	10	15	22.5	62.5	37.5	7.5	55	30	17.5	52.5
			20	20	20	60	50	15	35	47.5	15	37.5
			30	22.5	20	57.5	52.5	15	32.5	50	15	35
			Valores Médios	19.2	20.8	60	46.7	12.5	40.8	42.5	15.8	41.7
<i>M. communis</i>	♂	V	10	10	12.5	77.5	40	7.5	52.5	32.5	5	62.5
			20	10	12.5	77.5	47.5	5	47.5	37.5	12.5	50
			30	10	12.5	77.5	50	5	45	37.5	12.5	50
			Valores Médios	10	12.5	77.5	45.8	5.8	48.4	35.8	10	54.2
	♀	V	10	22.5	12.5	65	47.5	2.5	50	35	15	50
			20	22.5	12.5	65	52.5	10	37.5	42.5	17.5	40
			30	20	15	65	55	12.5	32.5	45	20	35
			Valores Médios	21.7	13.3	65	51.7	8.3	40	40.8	17.5	41.7
	♀	NV	10	12.5	7.5	80	32.5	15	52.5	30	17.5	52.5
			20	12.5	20	67.5	42.5	7.5	50	35	17.5	47.5
			30	12.5	20	67.5	45	7.5	47.5	35	15	50
			Valores Médios	12.5	15.8	71.7	40	10	50	33.3	16.7	50

Apesar de não haver amostra nos braços do olfatómetro, o número de insetos que se deslocaram ao braço direito foi diferente dos que se deslocaram ao braço esquerdo. Estas diferenças foram observadas tanto entre indivíduos de sexos diferentes e mesmo estado sexual (machos virgens e fêmeas virgens) como entre indivíduos do mesmo sexo e diferente estado sexual (fêmeas virgens e fêmeas não virgens) (Figura 28). As maiores diferenças nas respostas ao braço direito foram encontradas no bioensaio de *R. chalepensis* e *E. globulus*. As fêmeas virgens responderam significativamente mais ao braço direito (35 % vs 25 %) do que as fêmeas não virgens (9,2 % vs 14,2 %) e mais do que os machos virgens (10,8 % vs 9,2 %). Em relação ao braço esquerdo as maiores diferenças nas respostas foram encontradas nos bioensaios de *E. globulus* e *M. communis*. Nestes bioensaios as fêmeas virgens responderam significativamente mais (31,7 % vs 21,7 %) do que as fêmeas não virgens (10,8% vs 12,5 %) e machos virgens (15% vs 10 %).

Comparação das Respostas nos dois Braços do Olfatómetro

As diferenças observadas entre os dois braços do olfatómetro foram muito menores quando comparados para cada espécie de planta os resultados obtidos para o mesmo sexo e estado sexual. Através do teste de Wilcoxon foram comparados para os bioensaios das cinco plantas as respostas no braço direito com as respostas no braço esquerdo para cada um dos sexos e estado sexual. No caso dos machos virgens apenas foram encontradas diferenças nos bioensaios sem amostra de *R. chalepensis*, *C. canariensis* e *L. novocanariensis* sendo as respostas ao braço esquerdo (21,7 % vs 17,5 % vs 19,2 %) significativamente maiores que as respostas obtidas no braço direito (10,8 % vs 7,5 vs 10 %) (Figura 28). Em relação às fêmeas virgens foram encontradas diferenças significativas apenas no bioensaio com *R. chalepensis* sendo que, ao contrário dos machos, estas responderam mais para o braço direito (35 %) do que para o braço esquerdo (22,5 %). As fêmeas não virgens foram as únicas que não tiveram diferenças significativas entre as respostas dos dois braços nas cinco espécies de plantas.

Comparação das Respostas ao Longo do Tempo

Ainda que não havia qualquer amostra os insetos responderam de forma diferente durante os bioensaios. A análise das respostas totais (braço direito e esquerdo) dos insetos obtidas entre os 10, 20 e 30 minutos mostrou em alguns dos bioensaios diferenças entre indivíduos de sexos e estado sexual diferente (Figura 29). Nos machos as respostas foram mais ou menos constantes em todos os bioensaios à exceção do *E. globulus* e *L. novocanariensis* que aumentaram ao longo do tempo. No caso das fêmeas virgens as respostas também foram mais ou menos constantes durante os 30 minutos de duração dos bioensaios verificando-se apenas um aumento das respostas com o tempo no caso de *C. canariensis* e uma ligeira diminuição das respostas no bioensaio de *M. communis* (Figura 2). A resposta das fêmeas não virgens aumentaram com o tempo nos bioensaios de *E. globulus* e *L. novocanariensis* e diminuíram nos de *R. chalepensis*.

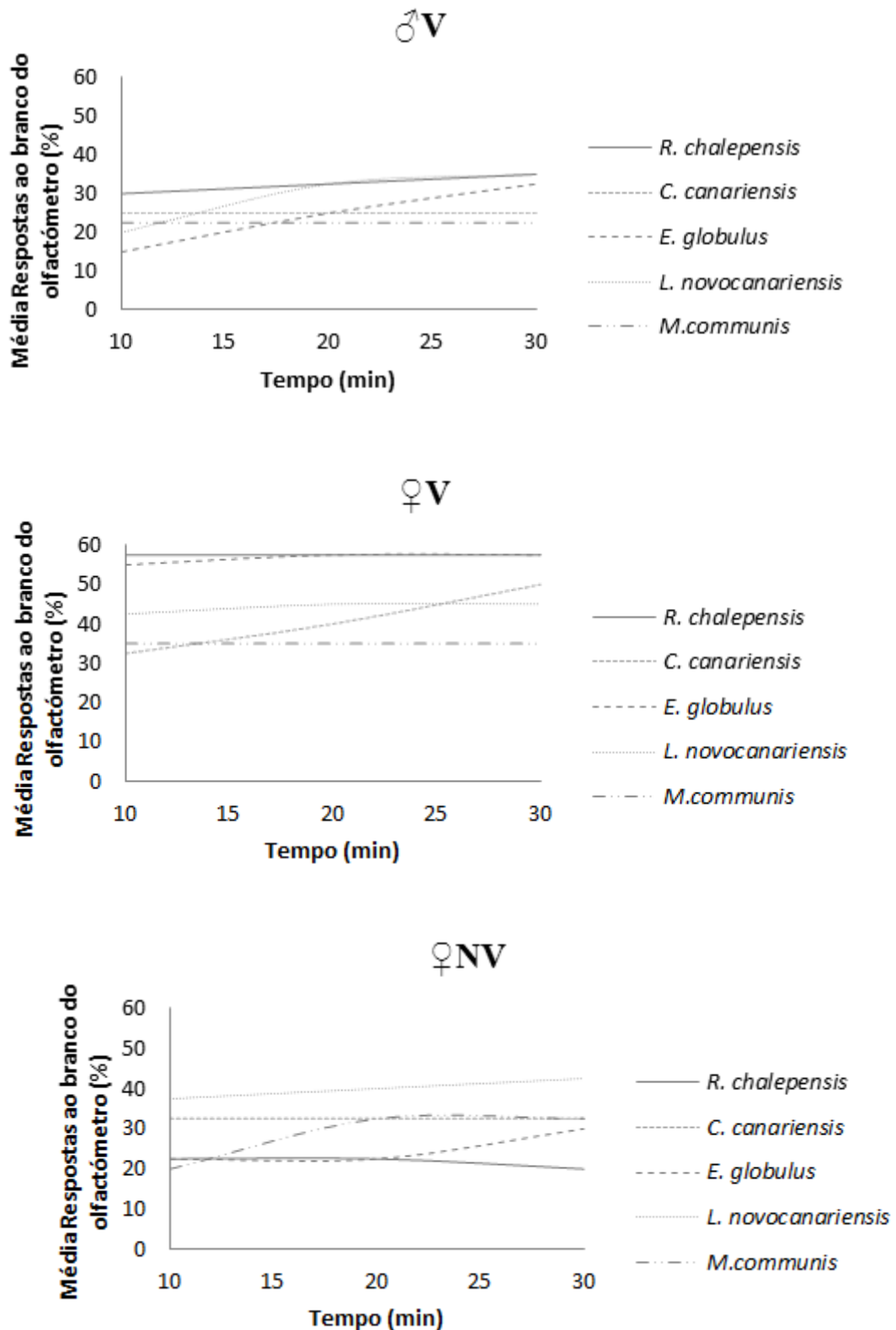


Figura 29: Comparação das respostas (positivas e negativas) dos insetos no olfactómetro sem amostra (branco) nos bioensaios com as cinco espécies de plantas ao longo do tempo (10, 20 e 30 minutos) de acordo com o sexo (♂ e ♀) e estado sexual: virgens (V) e não virgens (NV).

4.3.2.2 Olfatómetro com amostra da Proteína Alimentar

Comparação das Respostas

As respostas dos insetos à proteína alimentar estudadas nos bioensaios com as plantas foram semelhantes as obtidas nos bioensaios da proteína analisados primeira parte do trabalho. Em todos os bioensaios, independentemente do sexo e do estado sexual dos indivíduos, o número de indivíduos que se dirigiam ao braço com a proteína (resposta positiva) foi significativamente superior (34 – 53 %) ao número de indivíduos que se dirigiram ao braço sem amostra (3 – 18%) (Tabela 25). Estes resultados e os resultados dos bioensaios da proteína sugerem que os indivíduos que se dirigem ao braço com amostra não escolhem este braço ao acaso mas que têm uma preferência pelo braço com a proteína. O número de indivíduos que se deslocou ao braço com proteína foi diferente nos vários bioensaios. O bioensaio com maior resposta positiva foi o de *E. globulus* (39,2 -53,3 %) e com menor foi o de *R. chalepensis* (34,2 – 48,3 %). Em relação às respostas negativas os bioensaios com maior e menor respostas negativas foram os de *L. novocanariensis* (12,5 – 18,3 %) e *M. communis* (5,8 - 10 %), respetivamente. Estas diferenças entre bioensaios nas respostas a mesma amostra (proteína) entre indivíduos do mesmo sexo e estado sexual apesar de ser diferentes as percentagens representam apenas diferentes de poucos indivíduos (entre 4 a 6).

Comparação das Respostas para Diferente Sexo e Estado Sexual

Apesar de no geral haver semelhanças nas respostas dos insetos nos diferentes bioensaios, foram encontradas diferenças na percentagem média de respostas positivas e negativas à proteína entre indivíduos de diferentes sexos e estado sexual,. A semelhança dos bioensaios de proteínas, nos bioensaios com as plantas as percentagens médias de respostas positivas à proteína (braço direito com amostra) foram ligeiramente superiores para as fêmeas virgens (48 - 53 %), seguindo-se as fêmeas não virgens (34 - 50 %) e os machos virgens (38 - 48 %) (Tabela 2). A maior e menor resposta positiva para as fêmeas virgens, foram encontradas nos bioensaios de *E. globulus* (53,3 %) e *C. canariensis* (47,5 %), para as fêmeas não virgens nos bioensaios de *E. globulus* (50 %) e *R. chalepensis* (34,2 %) e para os machos nos bioensaios de *C. canariensis* (47,5 %) e *R. chalepensis* (37,5 %), respetivamente. Em todos os bioensaios os machos virgens (43 - 50 %) foram os que menos responderam seguindo-se as fêmeas não virgens (41 - 56 %) e as fêmeas virgens (30 - 40 %). Isto mostra que uma grande parte dos indivíduos independentemente do sexo e estado sexual não respondem a proteína.

Em relação às percentagens médias das respostas negativas estas foram semelhantes tanto nos machos como nas fêmeas. Os machos virgens apresentaram maior e menor resposta negativa nos bioensaios de *L. novocanariensis* (18,3 %) e *C. canariensis* (3,3 %), as fêmeas virgens nos bioensaios de *E. globulus* (17,5 %) e *M. communis* (8,3 %) e as fêmeas não virgens nos bioensaios de *R. chalepensis* (16,7 %) e *E. globulus* (4,2 %), respetivamente.

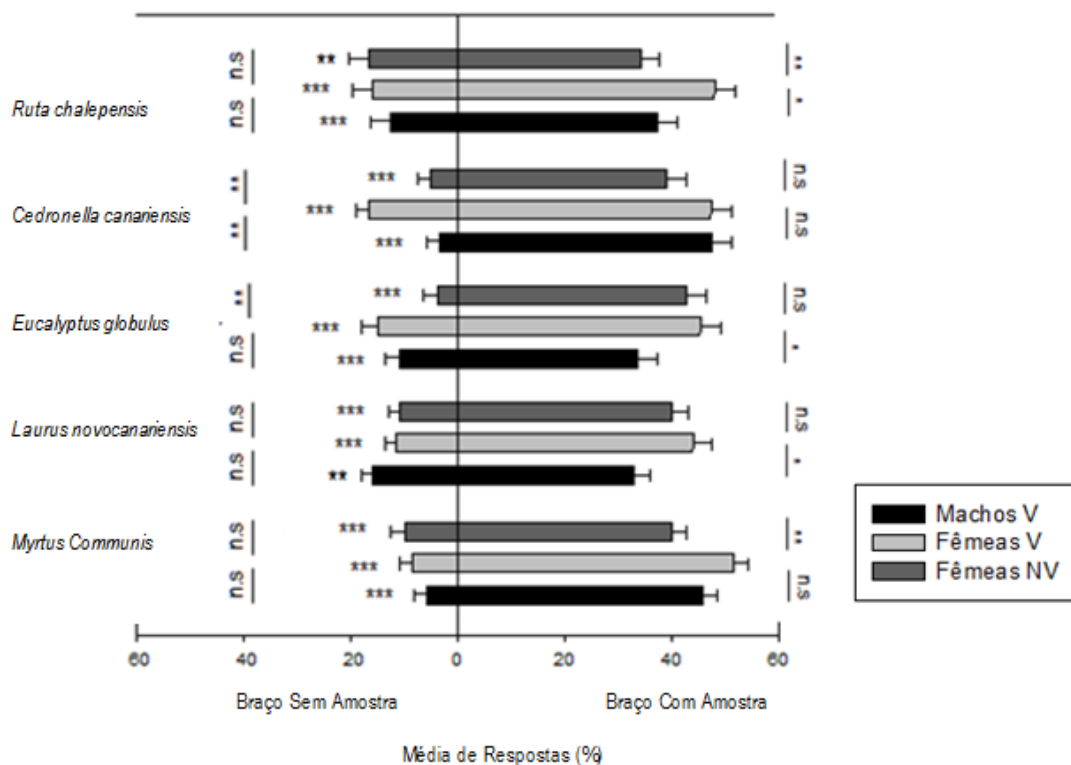


Figura 30: Percentagem média de respostas dos insetos dos dois sexos (virgens e não virgens) ao braço direito do olfatómetro sem amostra e ao braço esquerdo do olfatómetro com amostra (1g de proteína alimentar) obtidos nos bioensaios das 5 espécies de plantas. Aos insetos foi dada a hipótese de escolherem entre um dos dois braços do olfatómetro. As barras representam as médias das percentagens de resposta nos dois braços \pm o desvio padrão. Os símbolos ao lado das barras representam as diferenças entre as percentagens de decisão dos insetos que se deslocam entre o braço direito e o braço esquerdo determinado pelo teste Wilcoxon para os indivíduos do mesmo sexo e estado sexual em cada um dos bioensaios das plantas. Os símbolos no lado direito, fora das barras, representam as diferenças nas respostas obtidas no braço direito entre indivíduos de sexos diferentes e mesmo estado sexual (machos virgens e fêmeas virgens) ou entre indivíduos do mesmo sexo e diferente estado sexual (fêmeas virgens e fêmeas não virgens). Os símbolos no lado esquerdo, fora das barras, representam as diferenças entre as respostas obtidas no braço esquerdo entre indivíduos de sexos diferentes e mesmo estado sexual (machos virgens e fêmeas virgens) ou entre indivíduos do mesmo sexo e diferente estado sexual (fêmeas virgens e fêmeas não virgens). Os valores das duas margens laterais foram determinadas pelo GML. Abreviaturas n.s. ($p > 0,05$) não significativa; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Comparação das Respostas do Braço Direito e do Braço Esquerdo Para Diferente Sexo e Estado Sexual

Através do teste de Wilcoxon foram comparados as respostas no braço direito (respostas positivas) com as respostas no braço esquerdo (respostas negativas) para cada um dos sexos e estado sexual. Em todos os casos os insetos responderam significativamente mais ao braço com proteína do que ao braço sem proteína (Figura 30). Através do GML no geral foram encontradas diferenças nas respostas (positivas e negativas) entre indivíduos de sexos diferentes e mesmo estado sexual (machos virgens e

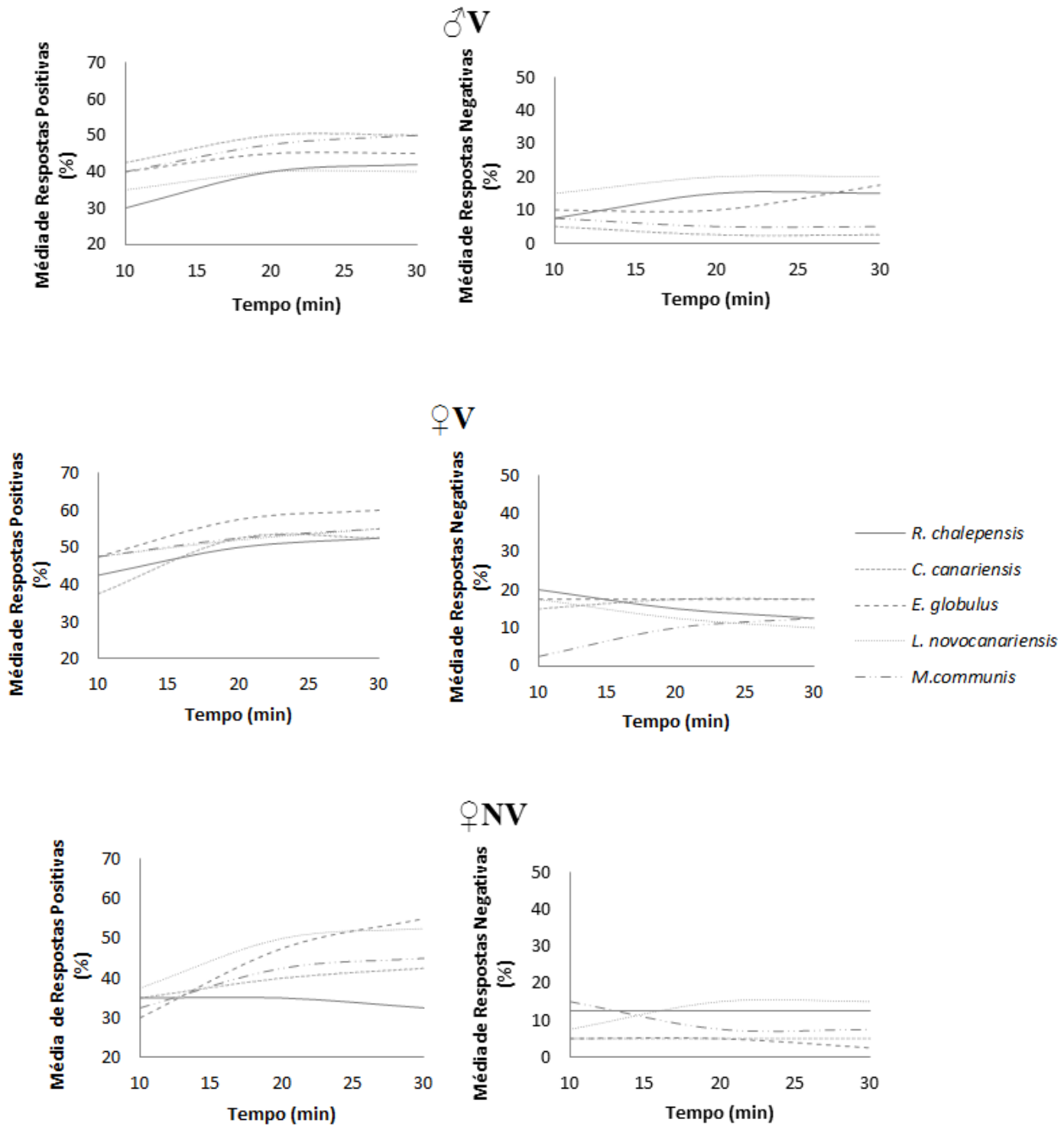


Figura 31: Comparação das respostas (positiva e negativa) dos insetos à proteína alimentar nos diferentes bioensaios ao longo do tempo (10, 20 e 30 minutos) de acordo com o sexo (♂ e ♀) e estado sexual (V virgens e NV não virgens).

fêmeas virgens) ou entre indivíduos do mesmo sexo e diferente estado sexual (fêmeas virgens e fêmeas não virgens) (Figura 30). Isto sugere que em todos os casos os indivíduos que se dirigem ao braço com a proteína são significativamente mais que os que se dirigem ao braço sem proteína.

Quando comparadas as repostas nos dois braços de indivíduos de diferente sexo e maturidade sexual foram encontradas diferenças. As fêmeas virgens responderam significativamente mais que as não virgens no bioensaio de *R. chapelensis* (48,3 % vs 34,2 %) e de *M. communis* (51,7 % vs 40 %) e responderam significativamente mais que os machos no bioensaio de *R. chapelensis* (48,3 % vs 37,5 %), *E. globulus* (53,3 % vs 39,2 %) e *L. novocanariensis* (51,7 % vs 38,3 %).

Comparação das Respostas ao Longo do Tempo

Verificou-se ainda um ligeiro aumento ao longo do tempo na resposta positiva dos machos e das fêmeas à proteína em todos os bioensaios principalmente entre os primeiros 10 e 20 minutos de teste (Figura 31), estabilizado-se os valores aos 20 e os 30 minutos. A única exceção foi no bioensaio com *R. chapelensis* em que no caso das fêmeas não virgens o número de repostas positivas diminuiu com o tempo.

Em relação às repostas negativas verificou-se que estas mudam de acordo com o sexo e o estado sexual dos insetos. No geral aumentaram ligeiramente ao longo do tempo mas houve as exceções seguintes: nos machos virgens nos bioensaios de *C. canariensis* e *M. communis*, nas fêmeas virgens nos bioensaios de *R. chapelensis* e *L. novocanariensis* e ainda nas fêmeas não virgens em *E. globulus* e *M. communis* onde aí a resposta negativa diminuiu ao longo do tempo (Figura 31).

4.3.2.3 Olfatómetro com amostra de Extratos de Plantas

Comparação das Respostas

No geral, o número de indivíduos que se dirigiam ao braço com extrato (resposta positiva) foi superior (18 - 47%) ao número de indivíduos que se dirigiram ao braço sem amostra (resposta negativa) (6 - 31%) (Tabela 25). O extrato com maior resposta positiva foi o de *L. novocanariensis* (32,5 – 42,5 %) e com menor foi *R. chapelensis* (17,5 – 36,7 %). Em relação às repostas negativas os extratos com maior e menor de repostas negativas foram os de *R. chapelensis* (7,5 – 30,8 %) e *E. globulus* (6,7 – 17,5 %), respetivamente.

Comparação das Respostas para Diferente Sexo e Estado Sexual

As percentagens médias de repostas positivas e negativas aos extratos das plantas variaram com o sexo e estado sexual dos insetos. As repostas positivas aos extratos foram superiores para as

fêmeas virgens (32 - 47 %), seguindo-se os machos virgens (21 - 43 %) e as fêmeas não virgens (18 - 43 %) (Tabela 25). A maior e menor resposta positiva para as fêmeas virgens, foram encontradas nos extratos de *E. globulus* (46,7 %) e *C. canariensis* (31,7 %), para os machos virgens foram encontradas nos extratos de *L. novocanariensis* (42,5 %) e *E. globulus* (20,8 %) e para as fêmeas não virgens foram os extratos de *L. novocanariensis* (42,5 %) e *R. chalepensis* (17,5 %).

As percentagens médias de respostas negativas também foram superiores nas fêmeas virgens (15 - 31 %) seguindo-se os machos virgens (6 - 13%) e as fêmeas não virgens (14 - 29 %). A maior e a menor resposta negativa para as fêmeas virgens, foram encontradas nos extratos de *C. canariensis* (29,2 %) e *E. globulus* (14,2 %), para os machos virgens foram encontradas nos extratos de *C. canariensis* (12,5 %) e *L. novocanariensis* (5,8 %) e nas fêmeas não virgens os extratos de *R. chalepensis* (30,8 %) e *C. canariensis* (15 %), respetivamente.

Comparação das Respostas do Braço Direito com as do Braço Esquerdo Para Diferente Sexo e Estado Sexual

Para cada espécie de planta houve diferenças nas respostas positivas e negativas dependendo do sexo e estado sexual. Quando comparadas as respostas positivas pelo GML, observou-se que as fêmeas virgens responderam significativamente mais do que as fêmeas não virgens e mais do que os machos virgens apenas no *E. globulus* (46,7% vs 27,5 % vs 20,8 %) (Figura 32). Também no extrato de *R. chalepensis* (36,7% vs 17,5 %) e de *M. communis* (40,8 % vs 33,3 %) foram encontradas diferenças entre as respostas positivas das fêmeas virgens e das não virgens, respetivamente.

Em relação às respostas negativas foram encontradas diferenças significativas no extrato de *C. canariensis* (29,2 % vs 15% vs 12,5 %) sendo que, as fêmeas virgens responderam significativamente mais do que as fêmeas não virgens e mais do que os machos virgens, respetivamente. Diferenças na resposta negativa entre sexos foram encontradas nos extratos de *R. chalepensis* (26,7 % vs 7,5 %) e *L. novocanariensis* (24,2 % vs 5,8 %), sendo que, nestes dois casos as fêmeas virgens apresentaram maior número de respostas negativas quando comparadas com os machos virgens (Figura 32).

Pelo teste de Wilcoxon foram verificadas possíveis diferenças nas respostas positivas e negativas dentro de cada sexo e estado sexual para os bioensaios das cinco plantas (Figura 32). No geral, os insetos apresentaram maior número de respostas positivas, ou seja, dirigiram-se mais ao braço com extrato do que ao braço sem amostra à exceção do extrato de *R. chalepensis* onde as fêmeas não virgens apresentaram significativamente maior número de respostas negativas (30,8 %) do que respostas positivas (17,5 %). Outra exceção encontrada foi em relação às respostas (positivas e negativas) das fêmeas virgens. Estas não apresentaram diferenças significativas nos bioensaios com *R. chalepensis* (36,7% vs 26,7 %), *C. canariensis* (31,7% vs 29,2 %) e *L. novocanariensis* (32,5 % vs 24,2 %) o que indica que elas nestes três casos parecem ter respondido de forma semelhante nos dois braços.

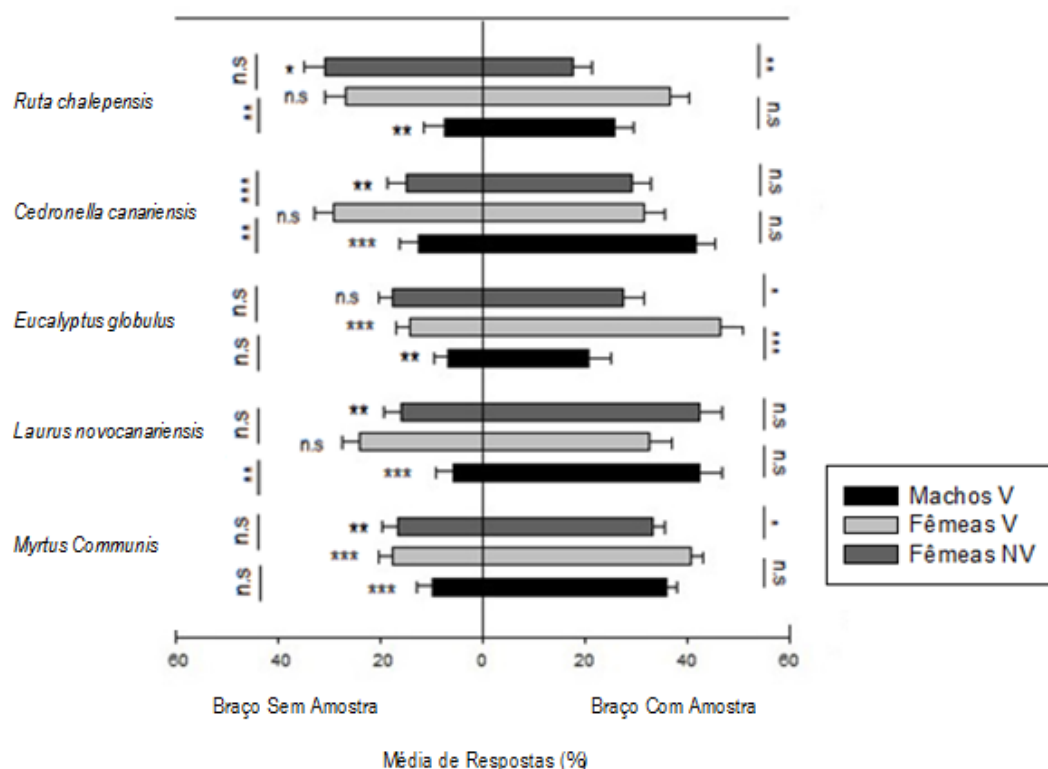


Figura 32: Percentagem média de respostas dos insetos dos dois sexos (virgens e não virgens) ao braço direito do olfatómetro sem amostra e ao braço esquerdo do olfatómetro com amostra (100 µl de extrato de planta) obtidos nos bioensaios das 5 espécies de plantas. Aos insetos foi dada a hipótese de escolherem entre um dos dois braços do olfatómetro. As barras representam as médias das percentagens de resposta nos dois braços \pm o desvio padrão. Os símbolos ao lado das barras representam as diferenças entre as percentagens de decisão do insetos que se deslocam entre o braço direito e o braço esquerdo determinado pelo teste Wilcoxon para os indivíduos do mesmo sexo e estado sexual em cada um dos bioensaios das plantas. Os símbolos no lado direito, fora das barras, representam as diferenças nas respostas obtidas no braço direito entre indivíduos de sexos diferentes e mesmo estado sexual (machos virgens e fêmeas virgens) ou entre indivíduos do mesmo sexo e diferente estado sexual (fêmeas virgens e fêmeas não virgens). Os símbolos no lado esquerdo, fora das barras, representam as diferenças entre as respostas obtidas no braço esquerdo entre indivíduos de sexos diferentes e mesmo estado sexual (machos virgens e fêmeas virgens) ou entre indivíduos do mesmo sexo e diferente estado sexual (fêmeas virgens e fêmeas não virgens). Os valores das duas margens laterais foram determinadas pelo GML. Abreviaturas n.s. ($p > 0,05$) não significativa; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Comparação das Respostas ao Longo do Tempo

Para ambos os sexos e estados sexuais verificou-se que no geral, as respostas positivas dos insetos aumentaram ligeiramente ao longo do tempo à exceção do bioensaio com *C. canariensis*. Este foi o único em que nos três casos o número de respostas positivas ao longo do tempo parece ter-se mantido mais ou menos constante (Figura 33). No caso das fêmeas não virgens verificou-se uma maior diferença ao longo do tempo nas respostas positivas de todas os bioensaios sendo de *L. novocanariensis* o único onde a resposta positiva sofre maior aumento ao longo do tempo.

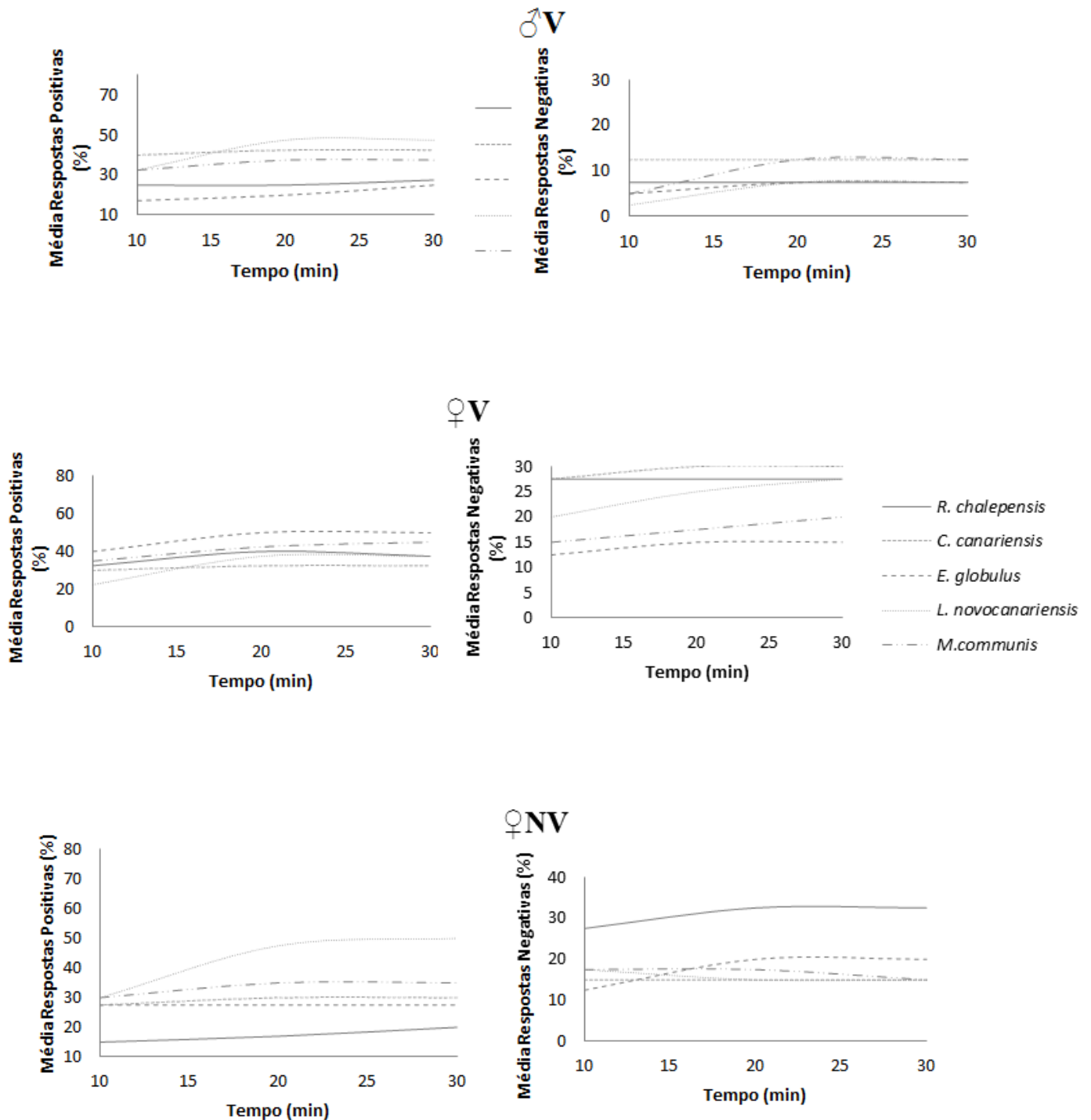


Figura 33: Comparação das respostas (positiva e negativa) dos insetos à proteína alimentar nos diferentes bioensaios ao longo do tempo (10, 20 e 30 minutos) de acordo com o sexo (♂ machos e ♀ fêmeas) e estado sexual (V virgens e NV não virgens).

Em relação às respostas negativas verificou-se que no geral, estas aumentam ligeiramente em todos os casos principalmente entre os primeiros 10 e 20 minutos de teste e manterem-se mais ou menos contantes aos 20 e 30 minutos. As exceções a isto foram observadas nas fêmeas não virgens dos bioensaios de *L. novocanariensis* e *M. communis* onde as respostas diminuíram. Além deste caso no

bioensaio de *C. canariensis* as respostas negativas das fêmeas virgens e não virgens e machos virgens mantiveram-se constantes ao longo do tempo.

Comparação das Respostas no Olfatómetro Sem Amostra e Com Amostra (Proteína Alimentar e Extratos das Plantas)

As percentagens médias das respostas obtidas com o mesmo grupo de insetos nos três casos: olfatómetro sem amostra, olfatómetro com proteína alimentar e olfatómetro com extrato de plantas foram comparadas para cada sexo e estado sexual. No geral, em todos os bioensaios (número de insetos que se dirigiram braço com amostra), independentemente do sexo e estado sexual, as *respostas positivas* variaram segundo o tipo de amostra. No geral as respostas foram superiores em bioensaios com amostras de proteína (34,2 – 53,3 %), seguindo-se aqueles com extratos das plantas (17,5 – 46,7 %) sendo menores as respostas no olfatómetro sem amostra (10 – 31,7 %) (Tabela 26).

No mesmo bioensaio a comparação entre o número de insetos que se dirigiu até ao braço com amostra (respostas positivas) com o número de insetos que se dirigiu até ao braço contrário sem amostra (respostas negativas) dão indicação sobre o potencial atrativo ou repelente de uma determinada amostra. Quando comparadas as respostas positivas e negativas obtidas em cada extrato de planta verificou-se que todos os bioensaios com extratos de plantas as respostas positivas foram superiores (31,7 - 46,7%) às respostas negativas (14,2 - 29,2 %) excepto, no extrato de *R. chalepensis* no caso das fêmeas não virgens. Neste caso o número de fêmeas que se dirigiu ao braço sem amostra foi significativamente superior ao registado no braço com amostra (17,5 vs 30,8 %, respetivamente) (Figura 33). Em 4 dos 8 bioensaios o número de respostas no braço sem amostra foi superior que ao do braço com amostra (Anexo 3). Estes resultados sugerem que a *R. chalepensis* pode ter um potencial efeito repelente para as fêmeas não virgens.

Para verificarmos se uma amostra é atrativa é necessário uma análise comparativa das respostas positivas em cada bioensaio. Se as respostas positivas aos extratos são superiores às obtidas no olfatómetro sem amostra, pode ser considerado que um determinado extrato pode ter efeito atrativo. Em todos os casos as respostas dos insetos aos extratos (31,7 – 46,7 %) foram superiores às respostas obtidas no olfatómetro sem amostra (16,7 – 31,7 %) no mesmo braço (braço direito), o que indica que os extratos de todas as plantas podem ter um potencial atrativo (Tabela 26). No entanto, as diferenças entre algumas dessas respostas não foram significativas. Isto ocorreu nos bioensaios com extratos da *R. chalepensis* tanto em machos virgens como em fêmeas não virgens e nos bioensaios com extratos de *L. novacanariensis* nas fêmeas virgens. Estes resultados podem sugerir tanto indiferença por parte dos insetos como alguma repelência.

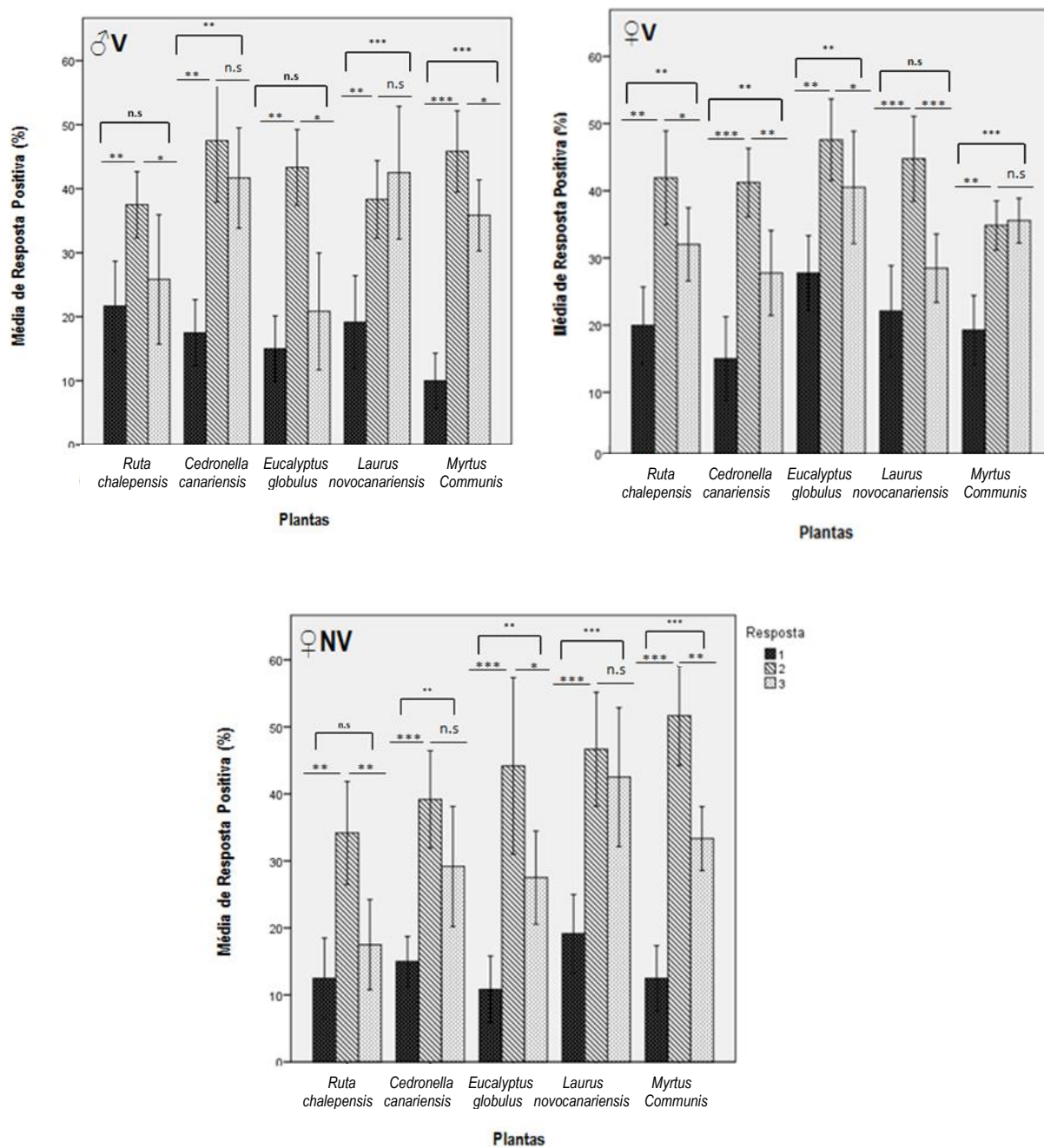


Figura 34: Percentagem média das respostas positivas obtidas para (1) o branco do olfatómetro; (2) a proteína alimentar e (3) os extratos das 5 espécies de plantas. As barras representam as percentagens médias das respostas positivas \pm o desvio padrão. Os símbolos à frente das barras (1) e (2) representam as diferenças encontradas nas respostas positivas dos mesmos indivíduos ao branco do olfatómetro e à proteína alimentar; os símbolos à frente das barras (2) e (3) representam as diferenças encontradas nas respostas positivas dos mesmos indivíduos entre a proteína alimentar e o extrato da planta; os símbolos nas barras representam as diferenças encontradas entre as respostas positivas dos mesmos indivíduos entre o (1) branco do olfatómetro e o (3) extrato da planta. As diferenças entre as respostas positivas dos insetos foram determinadas pelo teste Wilcoxon. Abreviaturas n.s. ($p > 0,05$) não significativa; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Como os insetos no olfatómetro sem amostra podem dirigir-se aos dois braços, comparar apenas os indivíduos do braço direito do olfatómetro que responderam aos extratos das plantas com os indivíduos do braço direito do olfatómetro sem amostra, ainda que as condições dos testes são

comparáveis, as respostas dos indivíduos podem não sê-lo. Isto porque se há um grupo de indivíduos que se deslocam quando não há amostra, estes podem dirigir-se a qualquer um dos dois braços. Um composto para ser atrativo deveria atrair mais insetos que todos os indivíduos que respondem no olfatómetro sem amostra. Assim, um critério de comparação mais estrito para avaliar o potencial atrativo, seria considerar a proporção dos indivíduos que responderam aos extratos das plantas com as respostas totais obtidos nos dois braços do olfatómetro sem amostra. Se o número de insetos que responderam ao extrato fosse superior às respostas nos dois braços do olfatómetro sem amostra pode considerar-se que provavelmente é atrativo. Aplicando este critério as plantas com potencial atrativo são menos. Por outro lado, o potencial atrativo da mesma planta não é o mesmo pois varia segundo o sexo e estado sexual dos indivíduos. Segundo este critério os voláteis das plantas com potencial atrativo seriam apenas os de *C. canariensis* (machos virgens), *E. globulus* (fêmeas não virgens), *L. novocanariensis* (machos e fêmeas não virgens) e *M. communis* (machos e fêmeas virgens e não virgens) (Figura 34).

Tabela 26: Valores médios das percentagens de respostas com os mesmos insetos obtidos nos bioensaios ao branco do olfatómetro, proteína alimentar e extrato da planta. Abreviaturas: V= virgens e NV= não virgens. RP=resposta positiva; RN= resposta negativa, NR=não respostas, RP/RN=valor de respostas positivas sobre o valor de respostas negativas, RP/NR= valor de respostas positivas sobre o valor de não respostas, R/NR= valor de respostas (positivas+negativas) sobre o valor de respostas negativas.

Bioensaios	Sexo/ Est.Se x.	Branco				Proteína				Extrato Planta				Comparações		
		RP1	RN1	NR	RP/R N	RP2	RN2	NR	RP/ RN	RP3	RN3	NR	RP/ RN	RP3/ RP1	RP3/ RP1+ RN1	RP3 /RP 2
<i>R. Chalepensis</i>	♂♂ V	21.7	10.8	67.5	2.01	37.5	12.5	50	3	25.8	7.5	66.7	3.44	1.19	0.79	0.69
	♀♀ V	22.5	35	42.5	0.64	48.3	15.8	35.9	3.06	36.7	26.7	36.6	1.37	1.63	0.64	0.76
	♀♀ NV	12.5	9.2	78.3	1.36	34.2	16.7	49.1	2.05	17.5	30.8	51.7	0.57	1.40	0.81	0.51
<i>C. canariensis</i>	♂♂ V	17.5	7.5	75	2.33	47.5	3.3	49.2	14.3 9	41.7	12.5	45.8	3.34	2.38	1.67	0.88
	♀♀ V	16.7	24.2	59.1	0.69	47.5	16.7	35.8	2.84	31.7	29.2	39.1	1.09	1.90	0.78	0.67
	♀♀ NV	15	17.5	67.5	0.86	39.2	5	55.8	7.84	29.2	15	55.8	1.95	1.95	0.90	0.74
<i>E. Globulus</i>	♂♂ V	15	9.2	75.8	1.63	39.2	12.5	48.3	3.14	20.8	6.7	72.5	3.1	1.39	0.86	0.53
	♀♀ V	31.7	25	43.3	1.27	53.3	17.5	29.2	3.05	46.7	14.2	39.1	3.29	1.47	0.82	0.88
	♀♀ NV	10.8	14.2	75	0.76	50	4.2	45.8	11.9	27.5	17.5	55	1.57	2.55	1.10	0.55
<i>L. novocanariensis</i>	♂♂ V	19.2	10	70.8	1.92	38.3	18.3	43.4	2.09	42.5	5.8	51.7	7.33	2.21	1.46	1.11
	♀♀ V	25	19.2	55.8	1.3	51.7	13.3	35	3.89	32.5	24.2	43.3	1.34	1.30	0.74	0.63
	♀♀ NV	19.2	20.8	60	0.92	46.7	12.5	40.8	3.74	42.5	15.8	41.7	2.69	2.21	1.06	0.91
<i>M. communis</i>	♂♂ V	10	12.5	77.5	0.8	45.8	5.8	48.4	7.9	35.8	10	54.2	3.58	3.58	1.59	0.78
	♀♀ V	21.7	13.3	65	1.63	51.7	8.3	40	6.23	40.8	17.5	41.7	2.33	1.88	1.17	0.79
	♀♀ NV	12.5	15.8	71.7	0.79	40	10	50	4	33.3	16.7	50	1.99	2.66	1.18	0.83

Quando comparada as respostas positiva obtidas no olfatómetro com extratos de plantas com as respostas positivas da proteína obtidas nos bioensaios das mesmas plantas, verificou-se que o extrato de *L. novacanariensis* foi o único que apresentou para os machos virgens um potencial atrativo superior (42,5%) ao potencial atrativo encontrado na proteína alimentar (38,3%) embora não houvesse diferenças significativas entre os dois (Figura 34). Neste caso em cerca de 6 dos 8 bioensaios a resposta dos machos foram mais altas ao extrato do que à proteína. Nas restantes plantas e para os dois sexos e estado sexual diferente a proporção de respostas positivas obtidas em amostras com proteína foi superior à obtida com extratos de plantas.

5. DISCUSSÃO

Estandarização das Condições dos Testes

O combate da mosca da fruta tem estado focado no controlo dos insetos na fase adulta, altura em que é mais susceptível aos inseticidas. Apesar de terem sido utilizadas diversos métodos de controlo desta praga como a técnica do inseto estéril [11, 12] e armadilhas com inseticidas [83 – 86], até a data, o controlo desta espécie não tem tido grande sucesso [14]. Por este motivo, nos últimos anos, tem-se procurado principalmente em plantas novos compostos com atividade inseticida [19, 280, 281] ou repelente [4, 14] com o intuito de vir a ser utilizados sobre os frutos das plantas hospedeiras de forma a diminuir os ataques da mosca. Contudo, as respostas dos adultos de *C. capitata* aos óleos essenciais ou aos extratos de plantas com atividade repelente são ainda pouco conhecidas.

Análise dos Compostos Voláteis Presentes no Ar que Circula Dentro do Olfatómetro

Uma das dificuldades no estudo do comportamento dos insetos em relação aos odores de plantas está em comparar resultados obtidos através de métodos diferentes. A grande disparidade de métodos utilizados pelos vários autores, não possibilita uma análise comparativa das respostas dos insetos aos COVs isto porque os resultados variam muito segundo o tipo de equipamento, as condições dos ensaios ou ao estado fisiológico dos insetos utilizados [136]. Por exemplo, no caso de *C. capitata*, o comportamento dos insetos aos voláteis tem sido estudado através de eletroantogramas [62, 121, 130], túneis de vento [156, 159] ou olfatómetros [92, 137, 282]. No entanto, o tipo equipamento utilizado pode afetar o comportamento dos insetos, quer diretamente, devido à própria estrutura do mesmo, ou indiretamente, devido a presença de poluentes voláteis no ar ou ainda à dispersão dos voláteis no interior do equipamento [136]. Apesar disto, na maioria dos trabalhos não é referido se houve ou não uma análise previa dos compostos voláteis presentes no ar que circula dentro do equipamento [271 – 272]. Neste trabalho, foi analisado a composição volátil do ar que circula dentro do olfatómetro antes e após a sua lavagem e não foi encontrado nenhum composto volátil contaminante. Isto indica que nos bioensaios realizados, o ar que circulava no olfatómetro apenas continha os compostos voláteis das amostras testadas. A aplicação do carvão ativado, utilizado com frequência neste tipo de testes [271 – 273, 284, 284], e a lavagem do equipamento com água depois de cada bioensaio, podem ser considerados medidas suficientes para eliminar os eventuais COVs aspirados pela bomba do ar exterior do olfatómetro e/ou os resíduos voláteis do material utilizado (ex. mangueiras, rolas e tecidos).

Dispersão dos Voláteis da Amostra Dentro do Olfatómetro

O único estudo em que foi avaliada a resposta olfativa dos adultos de *C. capitata* no olfatômetro em forma de Y foi realizado por López [4] mas neste trabalho não indica desconhece-se qual foi dispersão e a concentração dos voláteis dentro do olfatômetro.

A correta dispersão e concentração dos voláteis da amostra ao longo do olfatômetro são essenciais pois podem influenciar as respostas dos insetos. Embora, seja assumido que o ar do olfatômetro tem maior concentração de voláteis no local onde é colocada a amostra e que a concentração deve diminuir progressivamente até a base ao longo do tubo e deve estar ausente no braço sem amostra [152], não são conhecidos trabalhos que tenham determinado a concentração de uma amostra ao longo do olfatômetro. Neste trabalho as quatro amostras do composto trimedlure (TML) tomadas em quatro pontos diferentes do olfatômetro (braço com amostra, centro, base e braço sem amostra), mostraram que a concentração deste composto diminuiu progressivamente dos braços à base do olfatômetro. No braço com amostra houve cerca de 10 vezes mais concentração de compostos voláteis do que no centro do olfatômetro (união entre os dois braços) e na base. No entanto, a concentração no braço com amostra foi cerca de 100 vezes superior a encontrada no braço sem amostra onde não seria de esperar presença de voláteis [152]. A dispersão do fluxo de ar é verificada com frequência apenas uma única vez no início dos bioensaios através de testes de fumaça [143, 285 – 287] mas a concentração e a dispersão dos compostos voláteis interior do olfatômetro não é verificada. Os testes de fumaça comparam se há distribuição equilibrada do fluxo de ar através dos braços do olfatômetro e permitem ajustar a taxa de fluxo de ar adequada ao bioensaio. São realizados normalmente com cloreto de amônio (NH_4Cl) [288] ou tetracloreto de titânio (TiCl_4) [283, 284] num olfatômetro disposto sobre um fundo preto. Estes compostos são colocados em frascos à entrada de cada um dos braços do olfatômetro sendo o fluxo de ar com a fumaça ajustado à entrada de cada um dos braços de forma a evitar turbulências.

Apesar de saber-se que a concentração da amostra afeta as respostas dos insetos [284] desconhece-se a existência de trabalhos que tenham verificado a dispersão de voláteis da amostra ao longo do olfatômetro e/ou que tenham detetado a sua presença no braço sem amostra. Além disso, estes resultados preliminares sugerem que nos estudos em que o comportamento dos insetos é estudado no olfatômetro importante determinar a presença de fluxo de ar no interior porque podem condicionar os resultados obtidos. Igualmente o tipo de técnica e/ou material utilizado na recolha do ar pode ser importante. Por exemplo, a técnica SPME utilizada neste estudo exige que a fibra utilizada na recolha de COVs presentes no ar seja colocada num recipiente fechado, sem circulação de ar. No nosso trabalho a fibra foi colocada no olfatômetro com o fluxo de ar ligado pelo que, o fluxo de ar pode ter dificultado a recolha dos COVs e assim afetar a determinação da sua concentração [289]. Além disto, a seringa modificada com a fibra utilizada, tinha um comprimento relativamente grande (cerca de 30 cm) que não permitia a sua colocação precisa no centro dos braços do olfatômetro, o que também pode afetar a

recolha dos voláteis. Os resultados deste trabalho mostram que tanto a análise dos compostos residuais como o fluxo dos compostos voláteis no interior do olfatómetro são elementos necessários para a standardização das condições dos bioensaios e para o desenho e melhoria de olfatómetros [143, 152, 288] de forma a permitir análises comparativas entre as respostas dos insetos a amostras.

Análise da Resposta dos Insetos Segundo as Condições dos Bioensaios

As respostas dos insetos no olfatómetro em forma de Y podem ser influenciadas por diversos fatores como o tempo de duração do bioensaio [146, 285, 290], o número de repetições do mesmo bioensaio realizado com os mesmos insetos, o braço do olfatómetro onde é colocada a amostra [271, 285, 291] ou o número de indivíduos utilizados em cada bioensaio [39, 42 – 44]. Além disto as características dos próprios insetos como o sexo [92, 290], o estado sexual [114, 132, 133] ou a idade [114] também são importantes. No único estudo com um olfatómetro em forma de Y em que foi analisado a resposta da mosca da fruta aos COVs de plantas [4] apenas a variável sexo foi considerada.

Efeitos da Repetição dos Bioensaios

Nos bioensaios com o olfatómetro com frequência os testes são repetidos utilizando os mesmos insetos [271, 285, 291] no entanto, os possíveis efeitos das repetições no comportamento dos insetos são pouco conhecidos. Neste trabalho observou-se que a resposta dos insetos não é sempre a mesma mas, pelo contrário, varia dependendo das vezes que os insetos estiveram em contato com a amostra. No geral, as respostas nos dois sexos ao braço com a amostra foram maiores na primeira repetição enquanto que, as respostas ao braço sem amostra parecem aumentar com o aumento do número de repetições. Os machos dirigiram-se mais ao braço sem amostra quanto maior foi o número de repetições, pelo contrário as fêmeas dirigiram-se mais ao braço sem amostra na primeira repetição. As diferenças observadas nas respostas (positivas e negativas) e não respostas ao longo das três repetições com mesmo grupo de insetos podem ser devidos a vários fatores como a habituação ou aprendizagem do local onde está a amostra. Wasserman [292] num trabalho com a mosca *Neobellieria bullata* (Diptera: Sarcophagidae), sugere que quando os insetos são utilizados nas repetições do mesmo bioensaio pode ocorrer habituação ou saturação dos recetores nervosos das antenas devido a ter um tempo prolongado de contato com a amostra e, por esta razão, ao longo do tempo ou ao longo das repetições os insetos podem deixar de responder aos voláteis da amostra. Já Chabaud [293] num estudo de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) refere que com as repetições do mesmo bioensaio pode ocorrer aprendizagem ou memorização do local onde é colocada a amostra. Isto poderá ter ocorrido neste trabalho já que, a amostra nas três repetições foi colocada sempre no mesmo braço e os indivíduos testados foram sempre os mesmos. Além disso, o intervalo entre as repetições foi curto e desta forma os insetos poderão ter aprendido em que lugar se encontrava a amostra. Outra possível causa da diminuição da resposta pode ser que os insetos se tenham cansado e tenham deixado de se deslocar com o tempo.

Porém os resultados obtidos não explicam porque os sexos respondem de forma diferente. As fêmeas são mais ativas, movem-se mais e apresentam maior número de respostas positivas nas três repetições quando comparados com os machos. Além de não haver um padrão geral comum nas respostas e nas não respostas nos dois sexos, as respostas variaram também segundo a idade de cada sexo. Os machos e as fêmeas de *C. capitata* tal como os de outros muitos insetos respondem de forma diferente aos voláteis [109], e estas diferenças também podem variar de acordo com a idade e estado de maturação dos adultos [100, 114, 132]. Os resultados mostram que o número de repetições afeta as respostas dos insetos e que estas variam segundo o seu estado sexual e desenvolvimento. Além disto, o número de indivíduos utilizados por grupo também parece ter afetado as respostas ao longo das três repetições. Em ambos os sexos verificou-se que os bioensaios com grupos de 15 indivíduos foram aqueles que apresentaram no geral, um menor número de respostas negativas e um maior número de não respostas. Por este motivo análises comparativas do comportamento dos insetos devem ter atenção, não só que os indivíduos sejam do mesmo sexo, idade e estado de maturação sexual, mas também que sejam da mesma repetição e de testes em que se tenha utilizado o mesmo número de indivíduos.

Braço do Olfatómetro Com Amostra

Para excluir possíveis efeitos dos braços do olfatómetro nas respostas [271, 285, 291], geralmente como medida de precaução após cada teste, os braços do olfatómetro foram rodados 180°C, Desta forma o braço que antes estava a direita passou a estar a esquerda. Análises comparativas das respostas obtidas no braço direito e no braço esquerdo do olfatómetro têm sido pouco estudadas. A análise dos resultados através do teste de Mantel-Haenszel não mostrou diferenças significativas quando comparadas separadamente para cada bioensaio as respostas positivas e negativas obtidas nos dois braços do olfatómetro. Também não houve diferenças nas respostas entre sexos nem entre indivíduos virgens e/ou não virgens. Resultados semelhantes foram obtidos quando o número de indivíduos por grupo variou.

Através do GML verificou-se que o conjunto das respostas positivas e negativas obtidas nos dois braços variaram consoante o sexo, idade, estado sexual e número de indivíduos por grupo. Os machos com 8 dias de idade em grupos de 5 indivíduos dirigiram-se mais à proteína quando esta foi colocada no braço direito e as fêmeas, em especial, as virgens em grupos de 5 indivíduos responderam de forma diferente nos dois braços quando tinham 8, 14 e 20 dias de idade. O facto de que o tamanho da amostra utilizado fosse relativamente baixo não exclui que os valores obtidos possam representar apenas diferenças individuais nas respostas dos insetos e não propriamente o resultado do efeito do olfatómetro. Estes resultados reforçam a necessidade de considerar em investigações futuras os possíveis efeitos do braço onde a amostra é colocada.

Tempo de Teste

Num mesmo bioensaio, a resposta de um inseto a estímulos olfativos pode ser influenciada pela duração do bioensaio, ou seja, pelo tempo em que os insetos estão em contato com o composto. Os insetos com o tempo podem deixar de responder ao estímulo porque pode ocorrer habituação ou saturação dos recetores nervosos das antenas dos insetos [292]. Na maioria dos trabalhos realizados com olfatómetro, o período de tempo que os insetos são deixados em contato com a amostra varia normalmente entre 3 a 60 minutos [146, 285, 290] sendo o mais frequente de 5 a 10 minutos [272, 291, 294]. No entanto, os critérios utilizados na seleção da duração do tempo dos bioensaios geralmente não são referidos [146, 285, 290]. Neste trabalho verificou-se que ao longo do tempo, os valores médios dos insetos que se dirigem ao braço com amostra aumentam. Estes resultados sugerem que se houver resposta positiva à proteína alimentar esta será observada logo nos primeiros 10 minutos do teste sendo os 20 minutos tempo de espera suficiente para registar as respostas esperadas. As respostas positivas nos dois sexos aumentam ligeiramente entre os 10 e os 20 minutos mantendo-se mais ou menos constantes entre os 20 e os 30 minutos. O fato de que os indivíduos que não responderam não tenham respondido mais com o passo do tempo sugere que mesmo que a concentração da amostra na base do olfatómetro possa vir a aumentar com o tempo (ver em acima), esta não altera o valor das não respostas. No trabalho de López [4] cada uma das moscas testadas foi colocada individualmente a explorar o tubo do olfatómetro sem fluxo de ar durante 5 minutos e, em seguida, o fluxo de ar foi activado mais 5 minutos. Ao final desse tempo a resposta do inseto foi registada. Os nossos resultados quando comparados com os obtidos por López sugerem que provavelmente os deste autor são inferiores ao que seria de esperar se as moscas fossem deixadas mais tempo com o fluxo de ar ligado. O tempo de contato do inseto com a amostra deverá ser cuidadosamente considerado em estudos futuros.

Sexo

As fêmeas da mosca da fruta responderam mais que os machos à proteína. A maior percentagem média de respostas positivas foi de 34,1 % para os machos e 53,3 % para as fêmeas. As fêmeas da mosca da fruta são, no geral, mais atraídas pelos diferentes tipos de proteínas alimentares utilizadas do que são os machos. Estes resultados foram confirmados tanto em experimentos realizados no campo [90, 295] como em experimentos realizados em laboratório sejam eles em tuneis de vento [296] ou em olfatómetros [92, 290]. No entanto, as diferenças entre as respostas dos dois sexos não se podem justificar por diferentes necessidades de proteína pois são semelhantes nos dois. A falta de um alimento proteico interfere tanto na duração do ciclo de vida como na emergência e no tamanho dos adultos [83]. Nas fêmeas, o consumo de proteína aumenta a produção de ovos [30, 67, 76], o que poderia explicar um número de respostas superior que ao encontrado em machos. Também no trabalho desenvolvido por López [4] foram encontradas diferenças nas respostas entre machos e fêmeas aos voláteis libertados pelos óleos essenciais de quatro espécies de plantas do género *Tagetes* (Asteraceae, Helenieae) sendo

que, a grande diferença foi encontrada no caso da *Tagetes minuta* que funcionou como atrativa para os machos, enquanto que, funcionou como repelente no caso das fêmeas pois evitaram o braço com a amostra.

Estado Sexual

O estado sexual dos indivíduos pode afetar o seu comportamento perante estímulos odoríferos. As fêmeas de *C. capitata* respondem aos estímulos olfativos de forma diferente consoante o seu estado de maturidade sexual [114, 132, 133], mas desconhece-se que isto ocorra nos machos. Neste trabalho os possíveis efeitos do estado sexual apenas se verificaram no caso das fêmeas. As fêmeas virgens responderam ligeiramente mais do que as não virgens a proteína alimentar mas as respostas variam com a idade. As fêmeas virgens de 5, 14 e 20 dias de idade responderam mais do que as não virgens. Porém, aos 8 dias de idade as fêmeas não virgens responderam um pouco mais à proteína alimentar do que as virgens. As necessidades nutricionais de proteína são semelhantes tanto em fêmeas virgens como nas não virgens pelo que esta não parece ser a causa das diferenças nas respostas. As fêmeas de *C. capitata* criadas em laboratório normalmente acasalam entre os 3 e os 5 dias de idade e, por volta dos 8 dias de idade, estão na idade de postura, altura em que o consumo de proteína aumenta para a produção de ovos [67, 76, 267]. Esta pode ser a causa de que se tenham dirigido mais fêmeas não virgens à proteína aos 8 dias de idade. Os resultados mostram que o estado de maturidade sexual é um fator importante. No geral o número de respostas das fêmeas virgens foi superior ao das fêmeas não virgens tanto a proteína alimentar como aos extratos da maioria das plantas estudadas. No trabalho desenvolvido por López [4] não foram comparadas as respostas de machos e fêmeas com diferentes estados sexuais.

Idade

A idade dos indivíduos é também um fator importante que afeta a resposta dos insetos [114]. No geral, a resposta dos insetos diminui com a idade. O envelhecimento pode provocar alterações no sistema sensorial reduzindo desta forma a capacidade de resposta [167]. A isto acresce que as necessidades nutricionais podem diminuir e, neste caso, podem reduzir também o consumo de proteína [30, 67, 76]. Geralmente nos estudos do comportamento da mosca da fruta, são utilizados indivíduos com idades compreendidas entre os 3 e os 10 dias [91, 92, 290], embora na maior parte dos trabalhos o efeito da idade não seja testado [282]. De forma semelhante, López [4] utilizou nos bioensaios insetos entre os 8 e 16 dias de idade, no entanto, não justificam a razão pela qual escolheram indivíduos destas idades.

Os resultados deste trabalho mostram que a idade afeta as respostas. Nos dois sexos, os indivíduos com idades compreendidas entre os 5 e os 14 dias apresentaram maior número de respostas tanto ao braço com amostra (positivas) como ao braço sem amostra (negativas) sendo que o número de respostas diminuiu drasticamente a idade de 20 dias. Independentemente do sexo e do estado sexual,

houve mais indivíduos que responderam mais ao braço sem amostra aos 5 dias de idade. Nesta idade os insetos poderão ainda não ter os órgãos sensoriais completamente maduros para poder detetar em que braço do olfatómetro está a amostra da proteína ou, simplesmente, podem ser mais ativos e por isso movem-se mais pelo olfatómetro.

Nos dois sexos a maior percentagem de respostas ao braço com amostra em indivíduos virgens e não virgens foi obtida em indivíduos com 8 dias de idade. Embora as respostas das moscas estejam claramente relacionadas com a idade, houve diferenças entre machos e fêmeas. As fêmeas jovens responderam mais à proteína alimentar do que os machos, condição que se altera apenas quando estes atingem os 20 dias de idade. Isto pode estar relacionado com o facto de que como o número de ovos que as fêmeas colocam por dia diminui com a idade (> 14 dias), logo a necessidade do consumo de proteína também começa a diminuir [30, 67, 76] e, por esta razão, aos 20 dias os machos respondem mais à proteína alimentar do que as fêmeas.

Número de Indivíduos por Grupo

Os insetos podem andar em grupos ou individualmente e ter comportamentos diferentes. Em condições naturais os sexos da mosca da fruta diferem no comportamento. Na natureza os machos ao atingir a maturidade sexual formam *leks* ou grupos de 3 ou 4 indivíduos de forma a atrair às fêmeas para acasalar-se [39, 42 – 44]. À diferença dos machos, as fêmeas não formam grupos e precisam de espaço suficiente para pôr os seus ovos. Elas protegem os seus locais de oviposição através da marcação desse local com uma feromona que afasta as outras fêmeas do local [65 – 66]. O tipo de comportamento observado em insetos no campo poderá explicar as diferenças entre as respostas obtidas nos bioensaios com número de indivíduos diferentes. Quer em machos quer em fêmeas o maior número de respostas no braço com amostra foram obtidas em grupos de 5 indivíduos e o maior número de respostas no braço sem amostra nos dois sexos foram obtidas em grupos de 10 indivíduos. Nos dois sexos quando foram utilizados grupos de 15 indivíduos aumentou o número de indivíduos que não responderam. Isto sugere que ao aumentar o número de indivíduos por ensaio os insetos respondem menos. Se o número de indivíduos aumenta, ao ter pouco espaço, os insetos podem parar de se movimentar e manter-se no mesmo local ou, pelo contrário, alguns podem movimentarem-se mais a procura de um espaço livre, independentemente do local onde está a amostra.

Um número de 15 ou 20 indivíduos no mesmo bioensaio pode ser demasiado grande e favorecer a libertação e aumento de feromonas no olfatómetro e assim mascarar os voláteis da amostra, ou serem mais atraídos pelo odor das feromonas. Sabe-se que tanto os machos virgens como os não virgens libertam feromonas sexuais [39, 42 – 44] ou feromonas de marcação no caso das fêmeas não virgens [65 – 66]. No trabalho de Lopez [4] os insetos foram estudados individualmente pelo que os seus resultados

não podem ser comparados com os nossos. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que em trabalhos futuros deverá verificar se foram libertadas feromonas e se a sua composição volátil e concentração pode afetar os resultados dos bioensaios.

Estado Alimentar dos Insetos

O efeito do estado alimentar dos insetos no comportamento foi analisado em insetos que tinham estado 1h ou 24h jejum e em insetos acabados de se alimentar. Os insetos que estiveram em jejum (1h e 24h) responderam significativamente mais que os insetos acabados de se alimentar. Apesar de não haver qualquer composto químico no olfatómetro, o número global de insetos que se movimentaram em direção a um dos braços do olfatómetro sem amostra foi mais alto nos insetos que estiveram em jejum 24 horas (31 – 53 %), seguindo-se os insetos que estiveram em jejum 1 hora (29 – 47 %) e, em menor número, os insetos acabados de se alimentar (20 – 27 %). O estado nutricional dos insetos pode influenciar a resposta aos compostos voláteis [152, 295]. No geral, quanto maior é a necessidade que um inseto tem em adquirir alimento, maior será a sua procura/movimento dentro do olfatómetro [152, 295].

Este trabalho mostra que os insetos em jejum movimentam-se mais mesmo sem amostra o que indica que quando estão com fome movimentam-se mais. Porém, este comportamento pode afetar os resultados esperados já que, muitas vezes, só pela necessidade em saciar a fome ou sede, um inseto pode procurar e se dirigir a uma fonte de alimento mesmo não gostando dele. Na mosca da fruta é desconhecida a existência de trabalhos que verifiquem a resposta de *C. capitata* aos voláteis com diferentes estados nutricionais. No trabalho de Lopez [4] o efeito do estado nutricional dos insetos não é estudado, no entanto, todos os insetos estudados estavam alimentados. Igualmente não há trabalhos publicados sobre o efeito do estado nutricional de *C. capitata* nas respostas aos compostos voláteis., Katsoyannos [137] num estudo sobre a resposta da mosca da fruta aos atrativos sexuais em dois tipos de olfatómetro diferentes, estudou a respostas de adultos em jejum entre 15 a 24h e encontraram que os insetos em jejum responderam mais do que os acabados de alimentar. Estes dados indicam que o tempo que os insetos estiveram sem se alimentar é importante e deve ser considerado nos bioensaios, pois do contrário, podem dar lugar a falsas respostas positivas.

Composição Volátil da Proteína alimentar e Análise da Resposta dos Insetos

O maior número de respostas quer em machos quer em fêmeas foram obtidos na maior parte dos bioensaios na primeira repetição. Por este motivo, e para propósitos comparativos, nas análises que se seguem são utilizados apenas os resultados das primeiras repetições.

A atração das moscas da fruta varia segundo o tipo de proteína alimentar utilizada [90, 92]. As proteínas alimentares são amplamente usadas como atrativos em armadilhas de cores e formas diversas geralmente em conjunto com outras substâncias úteis para o controle ou a deteção da mosca da fruta (ex. inseticidas) [83, 85, 87, 104]. As proteínas alimentares durante a sua decomposição libertam amónia, que junto com outros voláteis libertados, actuam como atrativos das moscas [92, 290]. A composição volátil de algumas proteínas alimentares é conhecida como a das proteínas Nu-Lure e GF-120 [297 – 301]. Recentemente a proteína FNI 210 obtida por fermentação (FNI, Fermentation Nutrient Ingredient) [89] tem vindo a ser utilizado na alimentação das moscas da fruta criadas em massa em laboratório (ex. Biofabrica da Camacha) porque aumenta a produção de ovos nas fêmeas [89]. A composição química deste nutriente é conhecida [89] mas não a sua composição volátil nem a sua percentagem de atração na mosca da fruta.

Na proteína alimentar FNI 210 foram encontradas neste trabalho cerca de 18 compostos voláteis dos quais, 12 são comuns aos encontrados por outros autores em outras proteínas hidrolisadas [297 – 301]. A maioria dos compostos comuns em proteínas alimentares são pirazinas [88] como a 2-metil pirazina; 2,5-dimetil pirazina; 2,3-dimetil pirazina; 2-etil, 6-metil pirazina; 2-etil, 5-metil pirazina e trimetil pirazina). Este grande número de pirazinas indica que a proteína alimentar utilizada apresenta carácter básico. Os compostos libertados pelas iscas mais básicas são dominados por pirazinas enquanto que, os compostos voláteis emitidos por iscas ácidas são dominados por aldeídos e acetonas [90]. Em menor número do que as pirazinas foram encontrados outros compostos comuns entre eles, aldeídos como, o benzaldeído (Buttery [298], DeMilo [88]) e o 3-metil butanal (Lee [301]; DeMilo [88]), ácidos como, o ácido acético (Buttery [298], Lee [301]), e outros compostos como, a butirólactona (Lee [301]) e o 2-acetil pirrol (Buttery [298]).

Ainda que não se saiba qual ou quais dos compostos encontrados, além da amónia, têm efeito na mosca da fruta, cerca de 34 % dos machos e 53 % das fêmeas dirigiram-se ao braço do olfatómetro com esta proteína, o que sugere que esta proteína é atrativa para estes insetos. Estes valores são comparativamente semelhantes aos encontrados por Mazor [92] em moscas com 10 dias de idade para as proteínas alimentares Buminal, Naziman e PIB-7, sendo a mais atrativa a Buminal e a menos atrativa a PIB-7. As percentagens de atração encontradas por este autora variaram entre 10 a 70 %. Apesar de Mazor ter utilizado também moscas criadas em laboratório, o tempo dos testes dele foram superior aos nossos (1h e 4 h) e o tipo de olfatómetro utilizado foi diferente, fatores estes que não permitem fazer uma análise comparativa dos resultados.

Os valores obtidos à proteína FNI 210 são semelhantes aos encontrados em armadilhas no campo o que indica que esta proteína é atrativa. Em testes de campo mostram que as percentagens de respostas positivas de machos e fêmeas às proteínas alimentares USB, Mazoferm, Nu-lure e Provesta andam à volta dos 50 % [302]. Barry [303] afirma que as diferenças entre as moscas selvagens e as

criadas em laboratório, devesse ao facto das primeiras não se alimentarem diariamente com proteína. Segundo este autor as moscas selvagens são mais ativas e mais facilmente atraídas às armadilhas com proteínas porque necessitam de procurarem alimento proteico. O alimento junto com outros estímulos visuais utilizados no campo para a atração das moscas como as armadilhas cromotrópicas [60, 61] contribuem ainda mais a aumentar o número de capturas dos indivíduos. Assim, os nossos resultados sugerem que a proteína FNI 210 é potencialmente interessante para utilizar no futuro nas armadilhas habitualmente utilizadas no campo.

As diferenças encontradas na área dos picos destes compostos, no início e final do dia, sugerem que há uma ligeira perda de volatilidade dos compostos com o passo das horas que, embora pequena, poderá afetar a resposta dos insetos. Segundo Mazor [92] a taxa de libertação da amónia presente nas proteínas alimentares pode variar dependendo das interações entre os fatores bióticos (ação microbiana) e abióticos (temperatura, precipitação, vento) e por este motivo, com frequência, a composição volátil altera-se com o passo do tempo. Desta forma será adequado testar no campo os efeitos ao longo do tempo enquanto em ensaios de laboratório é recomendável preparar novas amostras de proteína no início de cada teste.

Insetos que Não Respondem

Nos bioensaios da proteína alimentar e dos extratos das plantas foi observado um elevado número de não respostas tanto quando havia amostra como quando não havia. Na maior parte dos trabalhos realizados com olfatómetros as não respostas não são analisadas [4]. Os insetos normalmente são testados individualmente e, quando não respondem (positiva ou negativamente), geralmente são excluídos dos resultados [271, 294]. Contudo, analisar os indivíduos que não respondem é importante para compreender o comportamento dos insetos. Um elevado número de não respostas pode significar que a amostra não é atrativa, que é repelente ou que não tem qualquer efeito, além disso, pode indicar que a concentração de amostra utilizada por bioensaio poderá não ter sido a mais adequada para provocar uma resposta. Neste trabalho as percentagens médias de não resposta obtidas nos bioensaios da proteína alimentar tal como as percentagens médias de respostas (positivas e negativas) variaram de acordo com o sexo, estado sexual, idade e número de indivíduos por grupo. As respostas mais elevadas foram obtidas nos machos virgens seguindo-se as fêmeas não virgens e as fêmeas virgens. No geral, os insetos com 20 dias de idade e em grupos de 15 foram os que menos responderam. Estas percentagens de não resposta podem estar relacionadas com as próprias características físicas dos insetos. De acordo com Vissier [152, 153] as características físicas dos insetos em geral podem afetar a capacidade de orientação ou discriminação da fonte do odor.

Além das diferenças que pode haver nas não respostas entre indivíduos de sexo e estado sexual e idade diferente, outros fatores como variações nas condições ambientais nas quais foram realizadas os bioensaios ou nas condições alimentares podem influenciar indivíduos das mesmas características. A intensidade luminosa, a temperatura e a humidade são fatores que afetam o comportamento dos insetos [152]. Diferenças nestes fatores podem afetar de forma diferente os resultados dos vários testes. Contudo, as condições de temperatura, humidade e luminosidade (Anexos 13 e 14) em que foram realizados os bioensaios neste estudo foram semelhantes. Além disto, estas condições foram também semelhantes às utilizadas na criação e manutenção dos insetos, não havendo alterações drásticas que pudessem justificar um elevado número de não respostas nos bioensaios. A isto acresce que os bioensaios foram realizados sempre no mesmo local com o olfatómetro colocado sempre na mesma posição, sobre uma superfície branca de forma a evitar interferências visuais e sempre com intensidade de luz semelhante. Outra possível explicação poderá ser que este comportamento seja devido ao fato do olfatómetro estar inclinado 60° relativamente a superfície. Bioensaios com o olfatómetro colocados em ângulos diversos em relação a superfície seriam necessários para avaliarem um possível efeito da posição no comportamento dos insetos. O elevado número de não respostas em todos os bioensaios em insetos com as mesmas características sugere que na mosca da fruta existe variação nas resposta aos compostos voláteis.

Composição Volátil dos Extratos das Plantas e Análise das Resposta dos Insetos

Composição Volátil dos Extratos das Plantas

Os resultados da composição volátil das folhas de *R. chalepensis*, *C. canariense* e *E. globulus* encontrados neste estudo foram semelhantes quanto a composição química e às percentagens relativas de compostos, aos encontrados por outros autores para as mesmas estruturas [304 – 309]. As maiores diferenças quer qualitativas quer quantitativas registadas em relação aos dados publicados foram na composição volátil das folhas de *L. novacanariensis* [310, 311] e de *M. communis* [312, 313]. Quanto a composição volátil de *L. novacanariensis* as principais diferenças foram na proporção da classe e nos compostos maioritários encontrados. Neste trabalho a classe maioritária foi a dos monoterpenos oxigenados (68,3 %) onde o linanol (20,39 %) e o 1,8-cineole (36,97 %) foram os compostos maioritários. Rodilla [310] a partir de folhas verdes de *L. novacanariensis* recolhidas na ilha da Madeira na altura da primavera obteve uma fração muito maior de monoterpenos hidrocarbonetos em relação aos monoterpenos oxigenados (74% vs 25-26%) e encontrou como compostos maioritários o α -pineno (21 %), 1,8-cineole (15,8 %), β -pineno (15 %), 3-careno (5,6 %) e linalol (1,4 %). No nosso trabalho os compostos

α/β -pineno não foram encontrados e o composto 3-careno foi encontrado mas com uma área relativamente baixa (<1 %).

Quanto aos resultados obtidos para o *L. novacariensis* também foram diferentes dos de Macchioni [311] obtidos a partir de folhas de *L. novacariensis* recolhidas na ilha da Madeira. Este autor encontrou maior percentagem da classe dos sesquiterpenos (38,8 vs 2,7%) e menor da classe dos monoterpenos (36 % vs 68,3 %), encontrando como compostos maioritários o α -pineno (10,4%) com maior área, seguindo-se o 1,8-cineole (9,6%) e o β -selineno (7,2%). No trabalho desenvolvido por este autor não foi obtido o linalol. Este autor sugere ainda que as diferenças encontradas entre o seu trabalho e o trabalho de Rodilla [310] podem ser devidas a presença de diferentes quimiotipos de *L. novacariensis* na Madeira. Esta explicação também pode esclarecer as diferenças encontradas entre o nosso trabalho e o destes dois autores. Contudo, é preciso salientar que a técnica de extração utilizada por nós e por eles foi diferente o que pode influir nos resultados. Neste trabalho foi utilizada como técnica de extração a HS-SPME enquanto que os trabalhos publicados utilizaram como técnica de extração a hidrodestilação e posterior análise por GC-MS. A técnica de hidrodestilação utiliza temperaturas elevadas através da qual os constituintes naturais de uma amostra podem sofrer alteração por possível oxidação, além disto, devido a ação do calor, podem ainda ocorrer perdas dos compostos mais polares [257].

As diferenças encontradas no extrato de *M. communis* entre este trabalho e os dados publicados foram apenas na proporção de alguns compostos. Neste trabalho, a classe maioritária encontrada foi a classe dos monoterpenos oxigenados (86,8 %) sendo os compostos maioritários o 1,8-cineol (53,12 %), linalol (14,42 %), mirtenol (9,31 %) e α -terpinol (7,33 %). Estes compostos são comuns aos encontrados por outros autores nas folhas de plantas procedentes da Itália [312] e Portugal [313] mas, a diferença destes, no nosso trabalho a proporção dos compostos de acetato mirtenol, limoneno e α -pineno obtidas foram mais baixas. Tal como no caso anterior, estas diferenças poderão estar relacionadas com o método de extração utilizado [258] e/ou com a origem geográfica das amostras [243, 268]. Contudo, as diferenças na composição volátil encontradas tanto em *L. novacariensis* como em *M. communis* podem ainda estar relacionadas com outros fatores como a época do ano em que foi colhida a amostra, a fase de desenvolvimento da planta [243, 245, 266, 267], a localidade onde foi recolhida a amostra, a hora da colheita [243, 268], e ainda se planta sofreu ou não qualquer ataque por parte de insetos, fungos ou vírus [256].

Os resultados dos extratos de *R. chalepensis*, *C. canariensis* e *E. globulus* foram semelhantes aos dados publicados quer quanto as classes maioritárias como a composição química. No extrato da *R. chalepensis* a composição volátil encontrada teve como classe maioritária a classe das acetonas (85,5 %) onde o 2-undecanona (52,5 %) e o 2-nonanona (24,1 %) tiveram maior área. Resultados parecidas foram encontrados por outros autores em indivíduos do Irão [314], Ásia (Anatólia) [304] e Tunísia [305]. A diferença desta, em *C. canariensis* a classe dos monoterpenos oxigenados (93,5 %) foi a principal com a

pinocarvona como composto maioritária (84,1 %). Este também foi o composto maioritário encontrado por outros autores em extratos de folhas de indivíduos procedentes de Tenerife [306] e La Palma [307]. No extrato do *E. globulus*, ao igual que em outros trabalhos publicados, a classe de monoterpenos oxigenados (87,1 %) foi a maioritária sendo o composto 1,8-cineol (77,4 %) o que apresentou maior percentagem de área [308, 309]. O 1,8-cineol é o que determina o valor comercial do óleo desta espécie [308] e pode variar consideravelmente (48,7 – 86,7 %), tendo sido encontradas diferenças neste composto em indivíduos/populações. A percentagem deste composto nos indivíduos da Madeira é relativamente elevada quando comparada com indivíduos do Uruguai (64,5%), Califórnia (58%), Marrocos (82%) e Argentina (50-65%) sendo semelhante aos valores encontrados em indivíduos presentes em Cuba (77%), [308].

Análise da Resposta dos Insetos

Olfatómetro Sem Amostra

Um elevado número de indivíduos deslocaram-se aos braços do olfatómetro mesmo quando este não tinha amostra. O facto de na maior parte dos casos (75%) não haver diferenças significativas entre os dois braços sugere que esta deslocação não é devida à presença de restos de voláteis em um dos braços do olfatómetro mas que provavelmente é devida a uma tendência dos insetos a se dirigirem aos braços do olfatómetro. A análise das respostas (braço direito e esquerdo) dos insetos obtidas entre os 10, 20 e 30 minutos nos mostrou diferenças nos bioensaios com insetos do mesmo sexo e estados sexual o que indica que eles se vão deslocando pelo olfatómetro como uma tendência natural.

Este movimento poderá dever-se a diferenças de atividade entre indivíduos ou poderá estar influenciado pela inclinação do olfatómetro (60°) em relação a superfície. Vissier [152] sugere que algumas espécies de insetos (ex. pulgões *Aphis fabae* Scop.) têm uma tendência natural para subir pelo olfatómetro. No entanto, estas diferenças variaram consoante o sexo e o estado sexual dos indivíduos. As fêmeas virgens responderam no geral mais do que as fêmeas não virgens e do que os machos virgens mas estas diferenças podem ser devidas ao facto das fêmeas de *C. capitata* serem mais ativas do que os machos. Este trabalho vem reforçar a necessidade de determinar nos bioensaios se há respostas mesmo quando não há amostra e a importância de determinar as possíveis causas para poder determinar a relevância dos valores obtidos. Assim, para saber qual dos dois fatores pode ser a causa dos resultados seria necessário comparar os resultados do olfatómetro em diferentes posições.

Olfatómetro com Amostra da Proteína Alimentar

As respostas (positivas e negativas) e não respostas dos insetos à proteína alimentar obtidas na primeira parte deste trabalho foram semelhantes às obtidas nesta segunda parte. Nesta análise apenas puderam ser comparados os indivíduos com 8 dias e em grupos de 5. Tal como na primeira parte deste

trabalho os insetos responderam mais ao braço com proteína do que ao braço sem proteína, em ambos os casos, a percentagem de respostas positivas máxima foi cerca de 50 % e a mínima foi cerca de 35 %. As fêmeas virgens responderam sempre mais à proteína que as fêmeas não virgens e do que os machos virgens. As percentagens de resposta negativa foram semelhantes para ambos os sexos e estados sexuais sendo os machos virgens os que apresentaram maior número de respostas negativas e maior número de não resposta tal como na primeira parte.

Em relação ao tempo de teste verificou-se, tal como nos bioensaios da proteína, um ligeiro aumento ao longo do tempo na resposta positiva dos machos e das fêmeas à proteína em todos os bioensaios, principalmente entre os primeiros 10 e 20 minutos de teste. Entre os últimos minutos de teste e entre os 20 e os 30 minutos, o número de respostas parece em alguns casos ter-se estabilizado. No entanto, não foram encontradas diferenças nas respostas dos insetos entre a primeira e a segunda parte nos bioensaios com as plantas o que sugere que os insetos não responderam ao acaso em todos os bioensaios.

Olfatómetro Com Amostra de Extratos de Plantas

A partir de bioensaios realizados, sabe-se que os adultos da mosca da fruta são atraídos por um elevado número de compostos. No laboratório em testes com compostos individuais, os indivíduos desta espécie dirigem-se em direção a mais de 85 compostos voláteis de plantas [119, 122 - 126]. A maioria dos bioensaios têm testado a resposta dos adultos a compostos voláteis individuais através de principalmente da técnica do eletroantenograma [119, 121 - 123, 126] e túneis de vento [125] mas também tem sido realizados ensaios através de armadilhas para as moscas como a armadilha de Jackson [124]. Nestes trabalhos a resposta dos insetos em direção ao um determinado composto é interpretada como um possível atrativo. Na procura de compostos que possam ser úteis no controlo a mosca da fruta, a resposta aos compostos voláteis foi estudada sobretudo em aqueles compostos que se espera suscitem uma resposta dos insetos. Em especial os compostos mais estudados são os que contribuem ao odor dos frutos hospedeiros (ex. nectarina, laranja) utilizados pelas fêmeas para colocação dos ovos [119, 121, 124 - 126] ou, então, aqueles que fazem parte das feromonas sexuais dos machos e que são atrativos para as fêmeas [123, 126]. Na maior parte destes trabalhos as condições dos bioensaios foram semelhantes as utilizadas no nosso trabalho, ou seja, os adultos foram utilizados adultos jovens (2 os 8 dias) alimentados com proteína hidrolisada e água e os testes foram realizados em laboratório sob condições controladas. Estes testes mostram que a mosca da fruta responde positivamente a uma grande parte dos compostos voláteis encontrados por nós nos extratos das cinco espécies testadas. Em todos os casos, à exceção das fêmeas não virgens no extrato de *R. chalapensis*, o número de indivíduos que se dirigiu ao braço com o extrato foi sempre superior ao número de indivíduos que se dirigiu ao braço sem amostra.

Nos extratos das cinco espécies de plantas os compostos voláteis encontrados com maior potencial atrativo na mosca pertencem principalmente às famílias dos aldeídos, dos álcoois e dos monoterpenos. Os compostos da família dos aldeídos e álcoois são frequentemente encontrados no odor libertado pelos frutos como, o hexanal, 2-hexanal, 1-hexanol, trans-2-hexen-1-ol, cis-2-hexen-1-ol, trans-2-hexen-1-ol e o cis-3-hexen-1-ol [121]. À família dos monoterpenos pertencem alguns compostos que compõem a feromona sexual dos machos como linalol, trans- β -cimeno, mirtenol, mirceno, terpinoleno e limoneno [123, 315, 316]. No entanto, algumas variações são encontradas na composição volátil do odor sexual emitido pelos machos. Gonçalves [315] sugeriu que esta diferença pode estar relacionada com os tipos de fruta a partir da qual os insetos foram obtidos e/ou com a diferente dieta obtida durante a fase larval. Este facto pode explicar a capacidade da mosca em aceitar uma ampla variedade de compostos voláteis.

Todos estes compostos atrativos foram encontrados nos extratos das plantas testadas o que justifica que a *C. capitata* tenha tido no geral uma resposta positiva (atractiva) aos extractos das cinco espécies de plantas testadas nos bioensaios. No entanto, apesar de que a proporção/concentração destes álcoois e aldeídos nos extratos das plantas ser relativamente baixa, e a dos monoterpenos ser relativamente elevada em todos os extratos, os insetos não responderam melhor aos extratos que tinham mais monoterpenos. Por exemplo o extrato de *C. canariensis* apresentou como família química maioritária a dos monoterpenos com cerca de 96,7 % dos compostos, no entanto, a resposta dos machos e das fêmeas a esse extrato não foram tão elevadas como as respostas obtidas no extrato de *L. novacanariensis* em que o número de compostos da família química dos monoterpenos foi apenas 69 %.

A concentração dos compostos pode não ser um factor explicativo das respostas obtidas pois a *C. capitata* apresenta uma elevada seletividade para determinadas família químicas de compostos voláteis independentemente da sua concentração numa amostra [62, 121, 123] ou seja, nem sempre os compostos voláteis que contribuem maioritariamente para o odor de uma amostra (maior área) exercem maior poder atrativo. Assim, não tem de existir uma relação aparente entre a contribuição de um determinado componente volátil ao aroma da amostra (concentração relativa) e a magnitude de resposta do inseto a esse aroma. Isto coincide com os resultados do nosso trabalho, pois embora existam em todos os extratos elevados números de compostos atrativos para a mosca, a resposta dos insetos a esses extratos não foi sempre a maior. Os álcoois e aldeídos contribuem frequentemente para o odor das folhas verdes e/ou odor dos frutos verdes da maioria das plantas [121]. É conhecido que a maturação das plantas, especialmente dos frutos, afeta a composição qualitativa e quantitativa destes compostos, diminuindo os seus níveis e contribuindo menos ao aroma geral do fruto à medida que este vai amadurecendo [121]. Light [121] num trabalho sobre a atração da mosca da fruta a 44 compostos voláteis extraídos das nectarinas, mostrou que independentemente da contribuição (concentração) destes compostos ao odor geral da planta, eles originam uma grande resposta nos adultos de ambos os sexos quando comparados com outros compostos voláteis.

Além dos compostos referidos, outros compostos como o metil eugenol e o cis- α -copaeno são também conhecidos pelo seu elevado potencial de atração em *C. capitata* [10, 127]. Enquanto que o composto metil eugenol atrai fêmeas e machos, o cis- α -copaeno parece ser apenas atrativo para os machos [10, 127]. Por outro lado os machos expostos ao cis- α -copaeno aumentam o seu sucesso no acasalamento [120]. Estes dois compostos também são frequentemente encontrados nas plantas [10, 127] e ambos foram encontrados no extrato de *L. novocanariensis*. Apesar de que nenhum destes compostos não ser maioritários nos extratos, mas sim como compostos intermédios ambos com concentração semelhante, a presença destes compostos poderá explicar a maior resposta positiva dos machos a este extrato do que à proteína. Estes resultados sugerem que o extrato de *L. novocanariensis* tem um potencial atrativo superior ao da proteína embora as diferenças entre ambos não tenham sido significativas. As fêmeas virgens e não virgens também responderam muito a este extrato mas as percentagens de resposta não foram tão altas como as obtidas na proteína.

Em todos os casos a percentagem média de respostas positivas dos insetos aos extratos das plantas foi superior às obtidas no olfatómetro sem amostra e inferiores às obtidas nos bioensaios com a proteína alimentar. Estes resultados sugerem que os extratos das plantas, à exceção do de *L. novocanariensis*, apresentam um potencial atrativo inferior ao potencial atrativo da proteína, Embora as diferenças de respostas ao extracto *L. novocanariensis* e a proteína não tenham sido significativas estes resultados são encorajadores para procurar nos extractos desta planta compostos potencialmente atractivos.

Ainda que cerca de 30 dos 93 compostos voláteis totais encontrados nos extratos das espécies de plantas estudadas neste trabalho sejam conhecidos por apresentar um efeito atrativo [119, 122 - 126], alguns deles podem também ter efeito repelente ou, o mesmo composto pode ter efeitos diferentes segundo o estado sexual dos indivíduos. Por exemplo no caso das fêmeas de *C. capitata* as fêmeas virgens são mais atraídas pelo odor dos machos, no entanto, após o acasalamento elas trocam de preferência, optando pelo odor emitido pelos frutos das plantas hospedeiras [114, 132, 133]. Um dos compostos voláteis maioritários da feromona sexual dos machos é acetato de etilo [121] [207] [123]. Este composto foi encontrado neste trabalho nos extratos de *E. globulus* e *R. chalepensis* sendo maior a concentração no extrato desta última espécie. A presença deste composto no extrato da *R. chalepensis* pode ser a causa de que as fêmeas não virgens não tenham sido atraídas. Nos extratos de ambas plantas as respostas das fêmeas virgens foram mais baixas do que a das fêmeas não virgens e do que a dos machos. Além disso, as respostas das fêmeas não virgens obtidas nestes dois extratos foram inferiores as obtidas nos restantes extratos. As diferenças na preferência pelos diferentes extratos das plantas e as diferenças de respostas à proteína e no olfatómetro sem amostra mostram com clareza que os indivíduos da mosca da fruta respondem de forma diferente consoante o sexo e o estado sexual. No geral as fêmeas virgens responderam mais do que as fêmeas não virgens e mais do que os machos

virgens mas também os indivíduos do mesmo sexo e estado sexual variam de forma diferente aos extratos consoante a espécie de plantas.

Os potencial repelente de um composto é mais difícil de estabelecer que o potencial atrativo. No geral, o número trabalhos publicados onde é testado o efeito repelente de um composto ou extrato em insetos é muito inferior ao número de trabalhos onde é testado o efeito atrativo. Além de haver poucos dados publicados sobre repelência, as resposta repelentes ou neutras são difíceis de interpretar. Ao contrário das respostas atractivas, não é fácil de saber se quando um inseto não se dirige a uma determinada amostra é porque não gosta do composto ou porque lhe é indiferente. Nos bioensaios de atratividade/repelência de uma amostra em um olfactómetro em forma de Y, é suposto que quando uma amostra é atrativa os insetos seguem o odor libertado pela amostra até ao braço onde ela está [4, 135, 143]. Contrariamente, se uma amostra é repelente os insetos deverão seguir a direcção contrária à concentrações do odor, dirigindo-se assim para o braço sem amostra [4, 135, 143]. Se uma amostra não tem qualquer efeito no comportamento dos insetos (amostra neutra), eles seguirão ou não o odor até a sua fonte de emissão, ou seja, ao braço do olfactómetro com amostra [4, 135, 143]. Neste trabalho, a análise de dispersão de voláteis dentro do olfactómetro permite saber que no braço sem amostra, a concentração dos voláteis é 100 vezes inferior ao braço com amostra pelo se a resposta no braço sem amostra (negativa) for elevada e superior ao braço com amostra, esta indica que a amostra tem efeito repelente. No presente estudo tal comportamento só foi observado nas fêmeas não virgens no extracto da *R. chalepensis* sendo por isso este considerado o único extracto que pode ter potencialmente compostos repelentes.

Ainda que as respostas positivas são importantes para elucidar um potencial atrativo/repelente dos compostos voláteis, o elevado número de indivíduos de moscas da fruta que não responderam independentemente do bioensaio e características dos indivíduos (sexo, idade, estado sexual) também é um aspecto importante a salientar. Este elevado número sugere que nos bioensaios com mosca da fruta o número de indivíduos a utilizar por bioensaio deverá ser elevado. Neste trabalho o número total de indivíduos utilizados por sexo e estado sexual foi de 45 indivíduos mas como cerca de 50 por cento não responderam, os valores do número de indivíduos que responderam foram relativamente poucos pelo que em futuros bioensaios deveria utilizar-se no mínimo cerca de 100 insetos da mesma idade, sexo e estado sexual. Nos bioensaios realizados o número de indivíduos utilizados tem variado entre os 50 e os 250 indivíduos por bioensaio [121, 124].

Apesar de ser necessário aplicar metodologias precisas no estudo comportamento dos insetos, os resultados deste trabalho mostram que as plantas podem ter compostos voláteis que podem ser úteis para o controlo da mosca da fruta. Os dados aqui apresentados são encorajadores quanto a necessidade de realizar no futuro mais estudos sobre o comportamento da mosca da fruta.

6. CONCLUSÕES

Principais limitações e Perspetivas Futuras

Neste trabalho realizou-se pela primeira vez um estudo do comportamento dos insetos aos extratos de cinco espécies de plantas e à proteína alimentar (FNI 210) num olfatómetro em forma Y. Apesar de López [4] ter analisado a resposta dos adultos de *C. capitata* aos voláteis de plantas num olfatómetro em forma de Y, esta é a primeira vez que se analisa qual o efeito que tem o método utilizado no comportamento dos insetos por isso, foram analisadas não só as características dos insetos (idade, sexo, estado sexual, estado alimentar) como também as condições dos bioensaios (tempo de duração, número de indivíduos, número de repetições, efeito do braço onde foi colocada amostra). Esta metodologia estandardizada poderá vir a ser utilizada em trabalhos futuros o que permitirá também fazer uma análise comparativa com os resultados por nós obtidos embora, seja necessário aperfeiçoar alguns aspetos relacionados com a técnica utilizada para verificar de que forma se dispersam e concentram os voláteis no interior do olfatómetro.

Neste estudo verificou-se que a resposta dos insetos variou não só de acordo com as suas próprias características como também de acordo com as condições dos bioensaios. Estes resultados mostram que em trabalhos futuros a estandardização das condições nas quais vão ser realizados os bioensaios, geralmente pouco abordadas nos trabalhos de investigação, é essencial pois não só afeta os resultados como a sua interpretação.

O método utilizado na extração dos compostos voláteis dos extratos das plantas foi o mais adequado pois permitiu obter a composição volátil das plantas semelhante ao odor libertado quando no meio ambiente. A utilização de outros métodos que aplicam temperaturas elevadas ou solventes orgânicos (ex. álcoois ou acetonas) poderia alterar a composição do extrato o que provavelmente iria afetar a resposta dos insetos. No entanto, os extratos rapidamente perdem os seus compostos mais voláteis pelo que, seria conveniente que futuramente o comportamento dos insetos fosse estudado logo após as extrações.

A análise da composição volátil da proteína FNI 210 e dos extratos das cinco espécies de plantas mostrou que ambos têm muitos compostos potencialmente atrativos da mosca da fruta. No caso das plantas muitos dos compostos encontrados como os álcoois, aldeídos, acetonas e monoterpenos são conhecidos por estimular uma resposta atrativa na mosca da fruta. No futuro seria interessante avaliar a resposta da mosca da fruta a diferentes concentrações dos mesmos extratos das plantas e dos compostos individuais das mesmas com potencial atrativo utilizando além do olfatómetro outras técnicas

como a do eletroantenograma. Além disso, seria igualmente interessante testar outras plantas de composição volátil diferente às testadas com atividade repelente conhecida para outros insetos.

As respostas dos adultos de *C. capitata* à proteína alimentar e aos extratos das plantas variou de acordo com o sexo e estado sexual dos insetos. As respostas mais elevadas foram no geral, encontradas nas fêmeas virgens seguindo-se as fêmeas não virgens e com menor número de respostas os machos virgens. As melhores respostas à proteína foram obtidas aos 8 dias de idade e em grupos de 5 e as piores respostas foram obtidas aos 20 dias de idade e em grupos de 20. No futuro será importante determinar em mais detalhe quais os efeitos que pode ter o estado nutricional nos resultados e se as causas de uma percentagem elevada dos indivíduos não respondam são intrínsecas (ex. genéticas) ou devem-se a fatores externos.

As percentagens médias de respostas positivas das moscas aos extratos das plantas foram inferiores às obtidas na proteína e superiores às obtidas no olfatómetro sem amostra estes resultados sugerem que a maior parte dos extratos são atrativos, sendo o extrato de *L. novocanariensis* nos machos virgens o único que apresentou um potencial atrativo superior ao da proteína. À diferença destes extratos, o extrato de *R. chalepensis* parece ter potencial repelente para as fêmeas não virgens. No futuro seria importante voltar a testar estes efeitos aumentando o número o total de indivíduos por extrato e analisar a resposta os compostos indivíduos destas plantas através do eletroantenograma e em túneis de vento.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] White I. M., Elson-Harris M.M., "Fruit flies of economic significance: their identification and binomics.," *CAB International, Wallingford and ACIAR*, Canberra 1992.
- [2] Meyer M. D., Robertson, M. P., Peterson, A. T., Mansell, M. W., "Ecological niches and potencial geographical distributions of mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*) and Natal fruit fly (*Ceratitidis rosa*).," *Biogeography* 2008; 35:270-281.
- [3] Carey J. R., "Biodemography of the mediterranean fruit fly: Aging; longevity and adaptation in the wild.," *Experimental Gerontology* 2011; 46:404-411.
- [4] López S.B., López M.L., Aragón L.M., Tereschuk M.L., Slanis A.C., Feresin G.E., Zygadlo J.A., Tapia A.A., "Composition and anti-insect activity of essential oils from *Tagetes* L. species (Asteraceae, Helenieae) on *Ceratitidis capitata* Wiedemann and *Triatoma infestans* klug.," *Agricultural and Food Chemistry* 2011;5286-5292.
- [5] Light D.M., Jang E.B., Dickens J.C., "Electroantennogram esponses of the mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, to a spectrum of plant volatiles.," *Chemical Ecology* 1988; 14:159-180.
- [6] Vieira R.M.S., "A mosca da fruta *Ceratitidis capitata* (Wied.) na ilha da Madeira. 1952; 11-214".
- [7] Dantas L., Perreira R., Silva N., Costa R., "The SIT control programme against Medfly on Madeira Island.," *Proceedings of 6th International Fruit Fly Symposium* 2002; 127-130.
- [8] Gasperi G., Bonizzoni M., Gomulski L.M., Murelli V., Torti C., Malacrida A.R., Guglielmino C.R. , "Genetic differentiation, gene flow and the origin of infestations of the medfly, *Ceratitidis capitata*." *Genetica* 2002; 116:125-135.
- [9] Macleay S. W., "Notice of *Ceratitidis Capitata*, an insect very destrutive to orange.," *Zoollogy* 1829; 4:475-482.
- [10] Headrick D.H., Goeden R.D., "Issues concerning the eratication or establishment and biological control of the mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), in California.," *Biological Control* 1996; 6:412-421.
- [11] Perreira B.A.M.R, Brazão A., Carvalho J.P., Lindquist D., "Area-wide control of the Mediterranean fruit fly on Madeira with the sterile insect technique.," *In: Proceedings of the International Society of*

- Citriculture* 1996; 1:568-572.
- [12] Hendrichs J., Robinson A. S., Cayol J. P., Enkerlin W., "Medfly areawide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or eradication: the importance of mating behavior studies," *Florida Entomological Society* 2002; 85:1-13.
- [13] V. J. L. P. G. K. C. G. M. F. V. M. T. M. F. Lux S.A., "Effects of irradiation on the courtship behavior of medfly (Diptera, Tephritidae) mass reared for the sterile insect technique," *Florida Entomologist* 2002, 85:102-112.
- [14] Oliveira F.Q., Malaquias J.B., Figueiredo W. R.S., B.J. L., Beserra E. B., "Inhibition of fruit infestation by Mediterranean fruit fly using natural products," *African Journal of Biotechnology* 2012; 11:13922-13927.
- [15] K. M. A. M. B. E. Siskos E. P., "Insecticidal activity of Citrus aurantium peel extract against *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata* adults (Diptera: Tephritidae)," *Journal of Applied Entomology* 2009; 133:108-116.
- [16] Passino G.S., Bazzoni E., Moretti M. D. L., Prota R., "Effects of essential oil formulations on *Ceratitis capitata* Wied. (Dipt., Tephritidae) adult flies.," *Applied Entomology* 1999; 123:145-149.
- [17] Chang C.L., Cho, I. K., Li Q. X., "Insecticidal activity of basil oil, trans-anethole, estragole and linalool to adult fruit flies of *Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis* and *Bactrocera cucurbitae*," *Economic Entomology* 2009; 102: 203-209.
- [18] Vincenzo D.I., Massimo C., Daniela M., Paola N., Romano D., "Effects of a neem compound on the fecundity and longevity of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)," *Journal of Economic Entomology* 1999; 92:76-87.
- [19] Salvatore A., Borkosky S., Willink E., Bardón A., "Toxic effects of lemon peel constituents on *Ceratitis capitata*," *Journal of Chemical Ecology* 2004; 30:323-333.
- [20] Papachristos D.P., Kimbaris A.C., Papadopoulos N.T., Polissiou M.G., "Toxicity of citrus essential oils against *Ceratitis capitata* (Diptera:Tephritidae) larvae," *Annals of Applied Biology* 2009; 155:381-389.
- [21] Figueiredo W.R.S., Oliveira F.Q., Oliveira R., Batista J.L., Brito C.H., "Bioactivity of oil from *Croton grewoides* on the control of mediterranean fruit fly.," *Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal* 2010; 7:113-118.

- [22] Socolsky C., Fascio M.L., D'Accorso N.B., Salvatore A., Willink E., Asakawa Y., Bardon A, "Effects of p-vinylphenyl glycosides and other related compounds on the oviposition behavior of *Ceratitis capitata*," *Journal of Chemistry Ecology* 2008; 34:539-548.
- [23] López S.B.; López M.L., Aragón L.M., Tereschuk M.L., Slanis A.C., Feresin G.E., Zygadlo J.A., Tapia A.A., "Composition and anti-insect activity of essential oils from *Tagetes L.* species (Asteraceae, Helenieae) on *Ceratitis capitata* Wiedemann and *Triatoma infestans* klug," *Agricultural and Food Chemistry* 2011; 5286-5292.
- [24] Vieira R.M.S., "A mosca da fruta *Ceratitis capitata* (Wied.) na ilha da Madeira," 1952; 11-214.
- [25] Eskafi F.M., Kolbe M.M., "Predation on larval and pupal *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) by the *Solenopsis geminata* Ant (Hymenoptera Formicidae) and other predators in Guatemala," *Environmental Entomology* 1990; 19:148-153.
- [26] Maitland D.P., "Locomotion by jumping in the Mediterranean fruit-fly,," *Nature* 1992; 355:159-161.
- [27] Ovruski S.M., "Pupal and larval-pupal parasitoides (Hymenoptera) obtained from *Anastrepha Spp.* and *Ceratitis capitata* (Dipt: tephritidae) pupae collected in four localities of Tucuman province, Argentine," *Biocontrol* 1995; 40:367-370.
- [28] Cavalloro R., Delrio G., "Soil factors influencing the pupation of *Ceratitis capitata* Wiedemann," *Laboratory of Agricultural Entomology Filippo Silvestri* 1975; 32:190-195.
- [29] Aluja M., Norrbom A.L., "Fruit flies (Tephritida) phylogeny and evolution of behavior," *CRC Press, Boca Raton London New Your Washington, D. C.* 1999; 16:409-490.
- [30] Plácido-Silva M.D.C., Zucoloto F.S., Joachim-Bravo I.S., "Influence of protein on feeding behavior of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae): Comparison between Imature Males and Females," *Neotropical Entomology* 2005; 34:539-545.
- [31] Carey J.R., Krainacker D.A., Vargas R.I., "Life history response of female Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata*, to periods of host deprivation," *Entomologia Experimentalis et Applicata* 1986; 42:159-167.
- [32] Carey J.R., Lied, Pablo M., Hans-Georg W., Jane-Ling V., James W., "Dual modes of aging in Mediterranean fruit fly females," *Science* 1998; 281: 996-998.
- [33] Zanardi O.Z., Nava D.E., Botton M.; Grutzmacher A.D.; Jr R.M., Bisognin M., "Desenvolvimento e reprodução da mosca-do-mediterrâneo em caqui, macieira, pessegueiro e videira," *Pesquisa*

- Agropecuária Brasília* 2011; 46:682-688.
- [34] Christenson L.D., Foote R.H., "Biology of fruit flies," *Annual Review of Entomology* 1960; 171-192.
- [35] Arita L.H., "Reproductive and sexual maturity of the Mediterranean fruit fly," *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 1982; 24:25-29.
- [36] Yuval B., Blay S., Kaspi R., "Sperm transfer and storage in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae)," *Annals of the Entomological Society of America* 1996; 89:486-492(7).
- [37] Saul S.H., McCombs S.D., "Dynamics of sperm use in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): reproductive fitness of multiple-mated females and sequentially mated males," *Annals of the Entomological Society of America* 1993; 86:198-202(5).
- [38] Whittier T.S.; Shelly T.E., "Productivity of singly vs. multiply female Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)," *Kansas Entomology Society* 1993; 66:200-209.
- [39] Whittier T.S., Kaneshiro K.Y., Prescott L.D., "Mating behavior of Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in a natural environment," *Entomological Society of America* 1992; 85:214-218(5).
- [40] Carey J.R., "Host-specific demographic studies of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*," *Ecological Entomology* 1984; 9:261-270.
- [41] Myburgh A.C., "Diurnal rhythms in emergence of mature larvae from fruit and eclosion of adult *Pterandrus rosa* and *Ceratitis capitata*," *South African Journal of Agricultural Science* 1963; 6:41-46.
- [42] Shelly T.E., Weittier T.S., Kaneshiro K.Y., "Sterile insect release and the natural mating system of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)," *Annals of the Entomological Society of America* 1994; 87:470-481(12).
- [43] Arita L.H., Kaneshiro K.Y., "The dynamics of the lek system and mating success in males of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann)," *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 1985; 25:39-48.
- [44] Arita L.H., Kaneshiro K.Y., "Sexual selection and lek behavior in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)," *Pacific Science* 1989; 43:135-143.
- [45] Prokopy R.J., Hendrichs J., "Mating behavior of *Ceratitis capitata* on a field-Caged host tree," *Entomological Society of America* 1979; 72:642-648(7).

- [46] Baker P.S., Valk H. , "Distribution and behaviour of sterile Mediterranean fruit flies in a host tree," *Applied Entomology* 2009; 114:67-76.
- [47] Kaspi R., Yuval B., "Mediterranean fruit fly leks: factors affecting male location," *Functional Ecology* 1999; 13:539-545.
- [48] Shelly T.E., Whittier T.S., "Lek behavior of insects. Mating systems in insects and Arachnids," *Cambridge University Press, Cambridge* 1997; 273-293..
- [49] Eberhard W.G., "Copulatory courtship and cryptic female choice insects," *Biological Reviews* 1991; 66:1-31.
- [50] Briceño R.D., Ramos D., Eberhard W.G., "Courtship behavior of male *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) in captivity," *Florida Entomologist* 1996; 79:130-143.
- [51] Liimatainen J., Hoikkala A., Shelly T., "Courtship behavior in *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) comparison of wild and mass-reared males," *Annals of the Entomological Society of America* 1997; 90:836-843(8).
- [52] Whittier T. S., Kaneshiro K.Y., Prescott L.D., "Mating behavior of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in a natural environment," *Annals of the Entomological Society of America* 1992; 85:214-218(5).
- [53] Seo S.T., Vargas R.I., Gilmore J.E., Kurashima R.S., Fujimoto M.S., "Sperm transfer in normal and gama-irradiated, laboratory-reared Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae)," *Economic Entomology* 1990; 83:1949-1953(5).
- [54] Field S.A., Yuval B., "Nutricional status affects copula duration in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Insecta Tephritidae)," *Ethology Ecology Evolution* 1999; 11:61-70.
- [55] Étienne J., "Conditions artificielles nécessaires à l'élevage massif de *Ceratitidis rosa* (Diptera:Trypetidae)," *Entomologia Experimentalis el Applicata* 1973; 16:380-388.
- [56] Bateman M.A., "The ecology of fruit flies," *Annual Review of Entomology* 1972; 17:493-518.
- [57] Krainacker D.A., Carey J.R., Vargas R.I., "Effect of larval host on life history traits of the mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*," *Oecologia* 1987; 73:583-590.
- [58] Zucoloto F.S., "Acceptability of different brazilian fruits to *Ceratitidis capitata* (Diptera, Tephritidae) and fly performance on each species," *Brazilian journal of medical and biological reserach* 1993; 26:291-

- 298.
- [59] Prokopy R.I., Roitberg B.D., "Foraging behavior of true fruit flies," *American Scientist* 1984; 72:41-19.
- [60] Nakagawa S., Prokopy R.J., Wong T.T.Y., Ziegler J.R., Mitchell S.M., Urago R., Harris E.J., "Visual orientation of *Ceratitidis capitata* flies to fruit models," *Entomologia Experimentalis et Applicata* 1978; 24:193-198.
- [61] Levinson H.Z., Levinson A.R., Mueller K., "Influence of some olfactory and optical properties of fruits on host location by the Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata* Wied.)," *Applied Entomology* 1990; 109:44-54.
- [62] Light D.M., Jang E.B., Dickens J.C., "Electroantennogram responses of the mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, to a spectrum of plant volatiles," *Chemical Ecology* 1988; 14:159-180.
- [63] Papaj D.R., Averill A.L., Prokopy R.J., Wong T.T.Y., "Host-marking pheromone and use of previously established oviposition sites by the mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae)," *Insect Behavior* 1992; 5:583-598.
- [64] Liquido N.J., Cunningham R.T., Nakagawa S., "Host plants of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) on the island of Hawaii (1949-1985 survey)," *Economic Entomology* 1990; 83:1863-1878.
- [65] Prokopy R.J., Papaj D.R., Opp S.B., Wong T.T.Y., "Intra-tree foraging behavior of *Ceratitidis capitata* flies in relation to host fruit density and quality," *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 1987; 45:251-258.
- [66] Boller E.F., Hippe C., Prokopy R.J., Enkerlin W., Katsoyannos B.I., Morgante J.S., Quilici S., Stilinovic D.C., Zapater M., "Response of wild and laboratory-reared *Ceratitidis capitata* Wied. (Dipt., Tephritidae) flies from different geographic origins to a standard host marking pheromone solution," *Applied Entomology* 1994; 118:84-91.
- [67] Hendrichs J., Katsoyannos B.I., Papaj D.R., Prokopy R.J., "Sex differences in movement between natural feeding and mating sites and tradeoffs between food consumption, mating success and predator evasion in Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae)," *Oecologia* 1991; 86:223-231.
- [68] Prokopy R.J., Hsu C.L., Vargas R.I., "Effect of source and condition of animal excrement on attractiveness to adult of *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae)," *Environmental Entomology* 1993; 22:453-458(6).

- [69] Warburg M.S., Yuval B., "Circadian patterns of feeding and reproductive activities of Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) on various host in Israel," *Annals of the Entomological Society of America* 1997; 90:487-495(9).
- [70] Tsistsipis J.A., "Nutrition requirements. In fruit flies: Their biology, Natural enemies and control (A.S. Robinson and G. Hooper, eds.)," *In World Crop Pest (W.Helle, ed.) 3A Elsevier Science Publisher, Amsterdam* 1989;103-120.
- [71] Zucoloto F.S., "Feeding habits of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): can larvae recognize a nutritionally effective diet?," *Insect Physiology* 1987; 33:349-353.
- [72] Downer R.G.H., Matthews J.R., "Patterns of lipid distribution and utilization in insects," *American Zoologist* 1976; 16:733-745.
- [73] Waldbauer G.P., Friedman S., "Self-selection of optimal diets by insects," *Annual Review of Entomology* 1991; 36:43-63.
- [74] Krainacker D.A., Carey J.R., Vergas R.I., "Size-specific survival and fecundity for laboratory strains of two tephritid (Diptera:Tephritidae) species: implications for mass rearing," *Economic Entomology* 1989; 82:104-108(5).
- [75] Warburg M.S.; Yuval B., "Effect of energetic reserves on behavioral patterns of Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae)," *Oecologia* 1997; 112:314-319.
- [76] Warburg M.S., Yuval B., "Effects of diet and activity on lipid levels of adult Mediterranean fruit flies," *Physiological Entomology* 1996; 21:151-158.
- [77] Gothilf S., Galun R., Bar-Zeev M., "Taste reception in the Mediterranean fruit fly: Electrophysiological and behavioural studies," *Insect Physiology* 1971; 17:1371-1384.
- [78] Canato C.M., Zucoloto F.S., "Feeding behavior of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae): influence of carbohydrate ingestion," *Insect Physiology* 1998; 44:149-155.
- [79] Blay S., Yuval B., "Nutritional correlates of reproductive succes of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae)," *Animal Behavior* 1997; 54:59-66.
- [80] Kaspi R., Yuval B., "Post-teneral protein feeding improves sexual competitiveness but reduces longevity of mass reared sterile male mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae)," *Entomology Society of America* 2000; 93:949-955.

- [81] Shelly T.E., Kennelly S.S, McInnis D.O., "Effect of adult diet on signaling activity, mate attraction, and mating success in male mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae)," *Florida Entomologist* 2002; 85:150-155.
- [82] Yuval B., Kaspi R., Shloush S. Warburg M.S., "Nutritional reserves regulate male participation in Mediterranean fruit fly leks," *Ecological Entomology* 1998; 23:211-215.
- [83] Prokopy R.J., Papaj D.R., Hendrichs J., Wong T.T.Y., "Behavioral responses of *Ceratitidis capitata* flies to bait spray droplets and natural food," *Entomologia Experimentalis et Applicata* 1992; 64:247-257.
- [84] Prokopy R.J., Duan J.J., Vargas R.I., "Potential for host range expansion in *Ceratitidis capitata* flies: impact of proximity of adult food to egg-laying sites," *Ecological Entomology* 1996; 21:295-299.
- [85] Epsky N.D., Heath R.R., Guzman A., Meyer W.L., "Visual cue and chemical cue interactions in dry trap with food-based synthetic attractant for *Ceratitidis capitata* and *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae)," *Environmental Entomology* 1995; 24:1387-1395(9).
- [86] Katsoyannos B. I., Hendrichs J., "Food bait enhancement of fruit mimics to attract Mediterranean fruit fly females," *Applied Entomology* 1995: 119:211-213.
- [87] Gazit Y., Rossler Y., Epsky N.D., Heath R.R., "Trapping females of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Israel: comparison of lures and trap type," *Economic Entomology* 1998; 91:1335-1359(25).
- [88] DeMilo B. A., Lee C.J., Moreno D. S. and Martinez A. J., "Identification of volatiles derived from *Citrobacter freundii* fermentation of a trypticase soy broth.," *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996; 44: 607-612
- [89] Chang C. L., "Evaluation of yeast and yeast products in larval and adult diets for the oriental fruit fly, *Bactrocera dosalis*, and adult diets for the medfly, *Ceratitidis capitata*, and the melon fly, *Bactrocera curcurbitae*," *Insect Science* 2009; 9:23,.
- [90] Mazor M., Gazit S., Reuven G. and Efrat H., "Unattractiveness of three commercial proteinaceous fruit fly baits to honey bees.," *Crop Protection* 2003; 22:995-997.
- [91] Mazor M., "Competitiveness of fertilizers with proteinaceous baits applied in Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* Wied. (Diptera: Tephritidae) control.," *Crop Protection* 2009; 28:314-318.

- [92] Mazor M., Gothilf S. and Galun R., "The role of ammonia in the attraction of females of the Mediterranean fruit fly to protein hydrolysate baits," *Entomologia experimentalis et applicata* 1987; 43:25-29.
- [93] Averill A.L., Prokopy R.J., Sylvia M.M., Connor P.P., Wong T.T.Y., "Effects of recent experience on foraging in tephritid fruit flies," *Insect Behavior* 1996; 9:571-583.
- [94] Light D.M., Jang E.B., Dickens J.C., "Electroantennogram responses of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, to a spectrum of plant volatiles," *Chemical Ecology* 1988; 14:159-180.
- [95] Dickens J.G., Hart W.G., Light D. M., Jang E.B., "Tephritid olfaction: Morphology of the Antennae of Four Tropical Species of Economic Importance (Diptera: Tephritidae)," *Annals of the Entomology Society of America* 1988; 81:325-331.
- [96] Papadopoulos N.T., Shelly T.E., Nuri N., Jang E., "Olfactory and behavioral mechanisms underlying enhanced mating competitiveness following exposure to ginger root oil and orange oil in males of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)," *Biomedical and Life Sciences* 2006; 19:403-418.
- [97] Kouloussis N.A., Katsoyannos B.I., Papadopoulos N.T., Loannou C.S., Iliadis I.V., "Enhanced mating competitiveness of *Ceratitis capitata* males following exposure to citrus compounds," *Journal of Applied Entomology* 2010.
- [98] Faraone N., Caleca V., Bruno M., Vitagliano S., Cristofaro A., "Biological activity of metabolites extracted from Citrus spp. on *Ceratitis Capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)," *IOBC/wprs Bulletin* 2012; 74:167-173.
- [99] Pereira R.M.C., "Utilização de armadilhas no estudo da mosca do Mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera:Tephritidae), em citrinos no Algarve," *Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia* 1995.
- [100] Jang E.B., "Physiology of mating behavior in Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Chemoreception and male accessory gland fluids in female post-mating behavior," *Florida Entomological Society* 2002; 85:89-93.
- [101] Yack J.E., "The structure and function of auditory chordotonal organs in insects," *Microscopy Research and Technique* 2004; 63:315-337.
- [102] Sayeed O., Benzer S., "Behavioral genetics of thermosensation and hygro-sensation in *Drosophila*,"

- Neurobiology* 1996; 93:6079-6084.
- [103] Nyamukondiwa C., Terblanche J.S., "Thermal tolerance in adult Mediterranean and Natal fruit flies (*Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa*): effects of age, gender and feeding," *Journal of Thermal Biology* 2009; 34:406-414.
- [104] Katsoyannos B.I., "Effect of color properties of spheres on their attractiveness for *Ceratitis capitata* (Wiedemann) flies in the field," *Journal of Applied Entomology* 1987;104:79-85.
- [105] Agee H.R., Boller E., Remund U., Davis J.C., Chambers D.L., "Spectral sensitivities and visual attractant studies on the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), olive fly, *Dacus oleae* (Gmelin) and the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (L.) (Diptera, Tephritidae)," *Journal of Applied Entomology* 1982; 93:403-412.
- [106] Wu W.Y., Chen Y.P., Yang E.C., "Chromatic cues to trap the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*," *Insect Physiology* 2007; 53:509-516.
- [107] Katsoyannos B.I., Panagiotidou K., Kechagia I., "Effect of color properties on the selection of oviposition site by *Ceratitis capitata*," *Entomologia Experimentalis et Applicata* 1986; 42:187-193.
- [108] Drew R.A.I., Prokopy R.J., Romig M.C., "Attraction of fruit flies of the genus *Bactrocera* to colored mimics of host fruit," *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2003;107:39-45.
- [109] V. L. J. D. M. Schoonhoven L.M., "Insect-Plant Biology," Oxford 2005; Second Edition:143-186.
- [110] Bigiani A., Scalera G., Crnjar R., Barbarossa I.T., Magherini P.C., Pietra P., "Distribution and function of the antennal olfactory sensilla in *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera, Trypetidae)," *Bolletino di Zoologia* 1989; 56:305-311.
- [111] Field L.M., Pickett J.A., Wadhams L.J., "Molecular studies in insect olfaction," *Insect Molecular Biology* 2000; 9:545-551.
- [112] Mayo I., Anderson M., Burguete J., Chilida E.M.R., "Structure of superficial chemoreceptive sensilla on the third antennal segment of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)," *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 1987; 16:131-141.
- [113] Schneider D., "100 Years of Pheromone Research: An Essay on Lepidoptera," *Naturwissenschaften* 1992; 79:241-250.
- [114] Papadopoulos N.T., Kouloussis N.A., Katsoyannos B.I., "Effect of plant chemicals on the behavior of

- the Mediterranean fruit fly," *Fruit Flies of Economic Importance: From Basic to Applied Knowledge* 2006; 97-106.
- [115] Shelly T.E., Villalobos E.M., "Host plant influence of the mating success of male Mediterranean fruit flies: variable effects within and between individual plants," *Animal Behavior* 2004; 68:417-426.
- [116] Shelly T.E., McInnis D.O., "Exposure to ginger root oil enhances mating success to irradiated, mass-reared males of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae)," *Economic Entomology* 2001; 94:1413-1418, .
- [117] Shelly T.E., "Exposure to grapefruits and grapefruit oil increases male mating success in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae)," *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 2009; 41:31-36.
- [118] Papadopoulos N.T., Katsoyannos B.I., Kouloussis N.A., Hendrichs J., "Effect of orange peel substances on mating competitiveness of male *Ceratitidis capitata*," *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2001; 99:253-261.
- [119] Hernández M.M., Sanz I., Adelantado M., Ballach S., Primo E., "Electroantennogram activity from antennae of *Ceratitidis capitata* (Wied.) to fresh orange airborne volatiles," *Chemical Ecology* 1996; 22:1607-1619.
- [120] Shelly T.E., "Exposure to α -copaeno and α -copaeno containing oils enhances mating success of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae)," *Annals of Entomological Society of America* 2001; 94:497-502.
- [121] Light D.M., Jang E.B., Flath R.A., "Electroantennogram responses of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* to the volatile constituents of nectarines," *Entomologia Experimentalis et Applicata* 1992; 63:13-26.
- [122] Light D.M., Jang E.B., "Electroantennogram responses of the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis*, to a spectrum of alcohol and aldehyde plant volatiles," *Entomologia Experimentalis et Applicata* 1987; 45:55-64.
- [123] Jang E.B., Light D.M., Flath R.A., Nagata J.T., Mon T.R., "Electroantennogram responses of the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* to identified volatile constituents from calling males," *Entomologia Experimentalis et Applicata* 1989; 50:7-19.
- [124] Warthen J.D., Lee C.J., Jang E.B., Lance D.R., McInnis D.O., "Volatile, potential attractants from ripe

- coffe fruit for female Mediterranean fruit fly," *Journal of Chemical Ecology* 1997; 23:1891-1900.
- [125] Prokopy R.J., Hu X., Jang E.B., Vargas R.I., Warthen J.D., "Attraction of mature *Ceratitidis capitata* females to 2-heptanone, a compound of coffee fruit odor," *Journal of Chemical Ecology* 1998; 24:1293-1304.
- [126] Giner V.C., Balaguer A.G., Alamós M.M.H., Puerta C.M., Vivas A.G., Millo J.P., Yúfera E.P. , "Attractiveness of 79 compounds and mixtures to wild *Ceratitidis capitata* (Diptera:Tephritidae) in field trials," *Horticultural Entomology* 2001; 94:898-904.
- [127] Vargas R.I., Souder S.K., Mackey B., Cook P., Morse J.G., Stark J.D., "Field trials of solid triple lure (trimedlure, methyl eugenol, raspberry ketone and DDVP) dispensers for detection and male annihilation of *Ceratitidis capitata*, *Bactrocera dorsalis* and *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) in Hawaii.," *Journal of Economic Entomology* 2012; 105:1557-1565.
- [128] Sánchez G.H., Berzosa I.S., Giner V.C., Yúfera E.P., "Attractiveness for *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Dipt., Tephritidae) of mango (*Mangifera indica*, cv. Tommy Atkins) airborne terpenes," *Journal of applied Entomology* 2001; 125:189-192.
- [129] Hernández M.M., Sanz I., Adelantado M., Ballach S., Promo E., "Electroantennogram activity from antennae of *Ceratitidis capitata* (Wied.) to fresh orange airborne volatiles," *Journal of Chemical Ecology* 1996; 22:1607-1619.
- [130] Cossé A.A., Todd J.L., Millar J.G., Martínez L.A., Baker T.C., "Electroantennographic and coupled gas chromatographic-electroantennographic responses of the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* to male-produced volatiles and mango odor," *Journal of Chemical Ecology* 1995; 21:1823-1835.
- [131] Nishida R., Shelly Todd E., Whittier T.S., Kaneshiro K.Y., " α -Copaeno, a potential rendezvous cue for the mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*," *Journal of Chemical Ecology* 2000; 26:87-100.
- [132] Jang E.B., "Effects of mating and accessory gland injections on olfactory-mediated behavior in the female mediterranean fruit fly, *Ceratitidis Capitata*," *Insect Physiol* 1994; 41:705-710.
- [133] Levinson H.Z., Levinson A.R., Muller K., "Influence of some olfactory and optical properties of fruit on host location by the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wied.)," *Journal of Applied Entomology* 1990;109:44-54.
- [134] Lachmann A.D., Papaj D.R., "Effect of host stimuli on ovariole development in the walnut fly,

- Rhagoletis juglandis* (Diptera, Tephritidae)," *Physiological Entomology* 2001; 26:38-48.
- [135] Nerio L.S., Olivero-Verbel J., Stashenko E., "Repellent activity of essential oils: A review," *Bioresource Technology* 2010; 101:272-378.
- [136] Nerio L.S., Olivero-Verbal J., Stashenko E., "Repellent activity of essencial oils: A review," *Bioresource Technology* 2010; 101:372-378.
- [137] Katsoyannos B.I., Boller E.F., Remund U., "A simple olfactometer for the investigation of sex pheromones and other olfactory attractants in fruit flies and moths," *Journal of Applied Entomology* 1980; 90:105-208.
- [138] Ranjith A.M., "An inexpensive olfactometer and wind tunnel for *Trichogramma chilonis* Ishii (Trichogrammatidae: Hymenoptera)," *Journal of Tropical Agriculture* 2007; 45:63-65.
- [139] Backchine E., Pham-Deleque M.H., Kaiser L., Masson C., "Computer analysis of the exploratory behavior of insects and mites in an olfactometer," *Physiology & Behavior* 1990; 48:183-187.
- [140] Trulings T.C.J., Davison A.C., Tamó C., "A six-arm olfactometer permitting simultaneous observation of insect attraction and odour trapping," *Physiological Entomology* 2004; 29:45-55.
- [141] Kudon L.H., Berisford C.W., "An Olfactometer for Bark Beetle Parasites," *Journal of Chemical Ecology* 1981;7:359-366, .
- [142] Legal L., David J.R., Jallon J.M., "Toxicity and attraction effects produced by *Morinda citrifolia* fruits on the *Drosophila melanogaster* complex of species," *Chemoecology* 1992; 3:125-129 .
- [143] Geier M., Boeckh J., "A new Y-tube olfactometer for mosquitoes to measure the attractiveness of host odours," *Entomologia Experimentalis et Applicata* 1999; 92:9-19.
- [144] Ascoli A., Albert P.J., "Orientation Behavior of Second-Instar Larvae of Eastern Spruce Budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae) in a Y-Tipe Olfactometer," *Journal of Chemical Ecology* 1985; 11.
- [145] George D.R., Sparagano O.A.E., Port G., Okello E., Shiel R.S., Guy J.H., "Repellence of plant essential oils to *Dermanyssus gallinae* and toxicity to the non-target invertebrate *Tenebrio molitor*," *Veterinary Parasitology* 2009; 162:129-134.
- [146] Leberton S., Becher P.G., Hansson B.S., Witzgall P., "Attraction of *Drosophila melanogaster* males to food-related and fly odours," *Journal of Insect Physiology* 2012; 58:125-129.

- [147] Sanon A., Iboudo Z., Dabire C.L.B., Nebie R.C.H., Dicko I.O., Monge J.P., "Effects of *Hyptis spicigera* Lam. (Labiatae) on the behaviour and development of *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae), a pest of stored cowpeas," *International Journal of Pest Management* 2006;52:117-123.
- [148] Yoon C., Kang S.H., Jang S.A., Kim Y.J., Kim G.H., "Repellent Efficacy of Caraway and Grapefruit Oils for *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae)," *Journal of Asia-Pacific Entomology* 2007; 10:263-267.
- [149] Erler F., Ulug I., Yalcinkaya B., "Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*," *Fitoterapia* 2006; 77:491-494.
- [150] Smallegange R.C., Qiu Y.T., Van-Loon J.J.A., Takken W., "Synergism between ammonia, lactic acid and caboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae)," *Chemical Senses* 2005; 30:145-152.
- [151] Hern A., Dorn S., "Sexual dimorphism in the olfactory orientation of adult *Cydia pomonella* in response to alpha-farnesene," *Entomologia Experimentalis et Applicata* 1999; 92:63-72.
- [152] Visser J.H., Piron P.G.M., "An open Y-track olfactometer for recording of aphid behavioural responses to plant odours," *Proceedings Experimental and Applied Entomology* 1998; 9:41-46.
- [153] Visser J.H., "Host-Plant Finding By Insects: Orientation, Sensory Input and Search Patterns," *Journal of Insect Physiology* 1988; 34:259-268.
- [154] Chang F., HSü C.L., "Effect of percocene II on sex attractancy in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann)," *Entomological Society of America* 1982; 75:38-42(5).
- [155] Baker T.C., Jr C.E.L., "Wind tunnels in pheromone research," *Techniques in Pheromone Research* 1984; 75-110.
- [156] Quilici S., Ngoc T.N., "Response of female medfly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), to olfactory stimuli from various host plants in a wind tunnel," *Proceedings of the 6th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance* 2002-2004; 105-110.
- [157] AllardA., Baker C.C., Baker C.T., "House flies and pig manure volatiles: wind tunnel behavioral studies and electrophysiological evaluations," *Journal of Agricultural Entomology* 1996; 13:301-317.
- [158] Kainoh Yooichi, "Wind tunnel: a tool to test the fligh response to semiochemicals," *Wind Tunnels and*

Experimental Fluid dynamics Research, 89-98.

- [159] Jang E.B., Light D.M., "Attraction of female mediterranean fruit flies to the five major components of male-produced pheromone in a laboratory flight tunnel," *Journal of Chemical Ecology* 1994; 20:9-19.
- [160] Jones O.T., Lower R.A., Howse P.E., "Responses of male Mediterranean fruit flies, *Ceratitidis capitata*, to trimedlure in a wind tunnel to novel design," *Physiological Entomology* 1981; 6:175-181.
- [161] Naime J.M., Moraes M.C.B., Laumann R.A., Borges M. , "Electroantennograma para estudo comportamental de insetos," *Comunicado Técnico* 2006; 74:1-5.
- [162] Park K.C., Ocheing S.A., Zhu J., Baker T.C., "Odor discrimination using insect electroantennogram responses from an insect antennal array," *Chemical senses* 2002; 27:343-352.
- [163] Ngumbi E., Chen L., Fadamiro H., "Electroantennogram (EAG) responses of *Microplitis croceipes* and *Cotesia marginiventris* and their lepidopteran hosts to a wide array of odor stimuli: correlation between EAG response and degree of host specificity," *Journal of Insect Physiology* 2010; 56:1260-1268.
- [164] Jang E. B., Light D. M., Dickens J. C., T. P. McGovern and J. T. Nagata, "Electroantennogram responses of mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) to trimedlure and its trans isomers," *Journal of Chemical Ecology* 1989;15:2219-2231.
- [165] Dudareva N., Negre F., Nagegowda D.A., Orlova I., "Plant Volatiles: Recent advances and future perspectives," *Critical Reviews in Plant Sciences* 2006; 25:417-440.
- [166] Tholl D., Boland W., Hansel A., Loreto F., Rose U.S.R., Schnitzler J.P., "Practical approaches to plant volatile analysis," *The Plant Journal* 2006; 45:540-560.
- [167] Light D.M., Jang E.B., Dickens J.C., "Electroantennogram responses of the mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, to a spectrum of plant volatiles," *Chemical Ecology* 1988; 14:159-180.
- [168] Schoonhoven L.M., Loon J.J.A.V., Dicke M., "Insect-Plant Biology," *Oxford Biology, Second Edition* 2005; Chapter 4, 48-50.
- [169] Knudsen J.T., Tollsten L., Bergström L.G., "Floral scents - a checklist of volatile compounds by headspace techniques," *Phytochemistry* 1993; 33:253-280.
- [170] Dudareva N., Pichersky E., Gershenzon J., "Biochemistry of plant volatiles," *Plant Physiology* 2004; 135:1893-1902.

- [171] Yuan J.S., Himanen S.J., Holopainen J.K., Chen F.Jr., Neal S.C., "Smelling global climate change: mitigation of function for plant volatile organic compounds," *Cell Press* 2009; 323-331.
- [172] Pichersky E., Noel J.P., Dudareva N., "Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and longenuity," *Science* 2006; 311:808-811.
- [173] Bernays E.A., Chapman R.F., "Host-plant Selection by Phytophagous Insects," *Chapman & Hall* 1994;76-95.
- [174] Heldt H.W., Pichulla B., Heldt F., "Plant Biochemistry, Fourth edition," *ELSEVIER* 2011; 399-449.
- [175] Schoonhoven L.M., Jermy T., van Loom J.J.A, "Insect-Plant Biology," *Chapman & Hall* 1998 3:31-70.
- [176] Sharkey T.D., Wiberley A.E., Donohue A.R., "Isoprene Emission from Plants: Why and How," *Annals of Botany* 2008; 101:5-18.
- [177] Spinelli F., Cellini A., Marchetti L., Nagesh K.M., Piovene C., "Emission and Function of Volatile Organic Compounds in Response to Abiotic Stress," *Alma Mater Studiorum-Università di Bologna* 16:365-385.
- [178] Chen F., Tholl D., Dáuria J.C., Farooq A., Pichersky E., Gershenzon J., "Biosynthesis and Emission of Terpenoid Volatiles from Arabidopsis Flowers," *The Plant Cell* 2003; 15:481-494.
- [179] Dudareva N., Pichersky E., "Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents," *Plant physiology* 2000; 122:627-633.
- [180] Chen F., Ro D.K., Petri J., Gershenzon J., Bohlmann J., Pichersky E., Tholl D., "Characterization of a root-specific arabidopsis terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole," *American Society of Plant Biologists* 2004; 135:1956-1966.
- [181] Gang D.R., Wang J., Dudareva N., Nam H.K., Simon J.E., Lewinsohn E., Pichersky E., "An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil," *Plant Physiology* 2001; 125:539-555.
- [182] McCaskill D., Gershenzo J., Croteau R., "Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.)," *Biomedical and Life Sciences* 1992; 187:445-454.
- [183] Dudareva N., Pichersky E., Gershenzon J., "Biochemistry of plant volatiles," *Plant Physiology* 2004;

- 135:1893-1902.
- [184] Hopkins W.G., Huner N.P.A., "Introduction to plant physiology, Fourth Edition," Wiley 2009; 27:459-480.
- [185] Wittstock U., Gershenzon J., "Constitutive plant toxins and their role in defensive against herbivores and pathogens," *Current Opinion in Plant Biology* 2002; 5:1-8.
- [186] Estell R.E., James D.K., Ferdriksen E.L., Andreson D.M., "Within-plant distribution of volatile compounds on the leaf surface of *Flourensia cernua*," *Biochemical Systematics and Ecology* 2013; 48:144-150.
- [187] Maffei M.E., "Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles," *South African of Botany* 2010; 79:612-631.
- [188] Maffei M.E., Gertsch J., Appendino G., "Plant volatiles: Production, function and pharmacology," *Natural Product Reports* 2011; 28:1337-1474.
- [189] Herrmann A., "The chemistry and biology of volatiles," *John Wiley & Sons Ltd* 2010; 29-430.
- [190] Sharkey T.D., Chen X., Yeh S., "Isoprene increases thermotolerance of fosmidomicin-fed leaves," *American Society of Plant Physiologists* 2001; 125:2001-2006.
- [191] Copolovici I. O., Filella I., Llusà J., Niinemets Ü. and Peñuelas J. , "The capacity for thermal protection of photosynthetic electron transport varies for different monoterpenes in *Quercus ilex*," *Plant Physiology* 2005; 139: 485-496.
- [192] Loreto F., Mannozi M., Maris C., Nascetti P., Ferranti F., Pasqualini S., "Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves," *Plant Physiology* 2001; 126:992-1000.
- [193] Pichersky E., Gershenzon J., "The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense," *Current Opinion in Plant Biology* 2002, 5:237-243.
- [194] Reinhard J., Srinivasan M.V., Zhang S., "Olfaction: scent-triggered navigation in honeybees," *Nature* 2004; 427:411.
- [195] Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V., "Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil," *Journal of Applied Microbiology* 2003; 95:853-860.
- [196] Friedman M., Henika P.R., Mandrell R.E., "Bactericidal activities of plant essential oils and some of

- their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*," *Journal of Food Protection* 2002; 65:1545-1560.
- [197] Moraes C.M., Mescher M.C., Tumlinson J.H., "Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females," *Nature* 2001; 410:577-580.
- [198] Kessler A. Baldwin I.T., "Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature," *Science* 2001; 291:2141-2144.
- [199] Vancanneyt G., Sanz C., Farmaki T., Paneque M., Ortego F., Castañera P. and Sánchez-Serrano J. J., "Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance," *Plant Biology* 2001; 98:8139-8144.
- [200] Mercke P., Kappers I. F., Verstappen F. W. A., Vorst O., Dicke M. and Bouwmeester H. J., "Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants," *American Society of Plant Biologists* 2004; 135:2012-2024.
- [201] Degen T., Dillmann C., Marion-Poll F., Turlings T.C.J., "High genetic variability of herbivore-induced volatile emission within a broad range of maize inbred lines," *American Society of Plant Biologists* 2004; 135:1928-1938.
- [202] Kessler A., Baldwin I.T., "Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature," *Science* 2001; 291:2141-2144.
- [203] Shulaev V., Silverman P., Raskin I., "Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance," *Nature* 1997; 385:718-721.
- [204] Ruther J., Kleier S., "Plant-plant signaling: ethylene synergizes volatile emission in *Zea mays* induced by exposure to (Z)-3-hexen-1-ol," *Journal of Chemical Ecology* 2005; 31:2217-2222.
- [205] Farag M.A., Fokar M., Abb H., Zhang H., Allen R.D., Paré P.W., "(Z)-3-Hexanol induces defense genes and downstream metabolites in maize," *Planta* 2005; 220:900-909.
- [206] Kessler A. Halitschke R., Diezel C., Baldwin I.T., "Priming of plants defense responses in nature by airborne signaling between *Artemisia tridentata* and *Nicotiana attenuata*," *Oecologia* 2006; 148:280-292.
- [207] Rasmann S., Köllner T.G., Degenhardt J., Hiltbold I., Toepfer S., Kuhlmann U., Gershenzon J., Turlings T.C.J., "Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots,"

- Nature* 2005; 434:732-737.
- [208] Choochote W., Chaithong U., Kamsuk K., Jitpakdi A., Tippawangkosol P., Tuetun B., Champakaew D., Pitasawat B., "Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*," *Fitoterapia* 2007; 78:359-364.
- [209] Peterson C., Coast J., "Insect repellents-past, present and future," *The Royal Society of Chemistry* 2001;154-158.
- [210] Paula J.P., Gomes-Carneiro M.R., Paumgarten F.J.R., "Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil," *Ethnopharmacology* 2003; 88:253-260.
- [211] Sukumar K., Perich M.J., Boobar L.R., "Botanical derivatives in mosquito control: a review," *Journal of the American Mosquito Control Association* 1991;7:210-237.
- [212] Prajapati V., Tripathi A.K., Aggarwal K.K., Khanuja S.P.S., "Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus*," *Bioresource Technology* 2005; 96:1749-1757.
- [213] Hadis M., Lulu M., Mekonnen Y., Asfaw T., "Field trials on the repellent activity of four plant products against mainly *Mansonia* population in western Ethiopia," *Phytotherapy Research* 2003; 17:202-205.
- [214] Sharma S.K., Dua V.K., Sharma V.P., "Field studies on the mosquito repellent action of neem oil," *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 1995; 26:180-182.
- [215] Sharma V.P., Ansari M.A., Razdan R.K., "Mosquito repellent action of neem (*Azadirachta indica*) oil," *Journal of American Mosquito Control Association* 1993; 9:359-360.
- [216] Oyedele A.O., Gbolade A.A., Sosan M.B., Adewoyin F.B., Soyelu O.L., Orafidiya O.O., "Formulations of an effective mosquito repellent topical product from Lemongrass oil," *Phytomedicine* 2002; 9:259-262.
- [217] Pushpanathan T., Jebanesan A., Govindarajan M., "Larvicidal, ovocidal and repellent activities of *Cymbopogon Citratus* Stapf (Graminae) essential oil against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae)," *Tropical Biomedicine* 2006; 23:208-212.
- [218] Miró S.M.M., García J.J., Tornesello J., Marino P., Vecchia M.D., Tesoreiro D.M.V., Hermida L.G., "Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2010; 104:653-658.

- [219] Trongtokit Y., Rongsriyam Y., Komalamisra N., Apiwathnasorn C., "Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites," *Phytotherapy Research* 2005; 19:303-309.
- [220] Yang P., Ma Y., "Repellent effect of plant essential oils against *Aedes albopictus*," *Journal of Vector Ecology* 2005; 30:231-234.
- [221] Gbolade A.A., Oyedele A.O., Sosan M.B., Adewoyin F.B., Soyelu O.L., "Mosquito repellent activities of essential oils from two Nigerian *Ocimum* species," *Journal of Tropical Medicinal Plants* 2000; 1:146-148.
- [222] Curtis C.F., Lines J.D., Lu B.L., Renz A., "Natural and synthetic repellents," In: Curtis, C.F. (Ed.), *Appropriate Technology in Vector Control*. CRC Press, Florida 1989; Chapter 4.
- [223] Fradin M.S., Day J.F., "Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites," *The New England Journal of Medicine* 2002; 347:13-18.
- [224] Collins D.A., Brady J.N., Curtis C.F., "Assessment of the efficacy of quwenling as a mosquito repellent," *Phytotherapy Research* 1993; 7:17-20.
- [225] Odalo J.O., Omolo M.O., Malebo H., Angira J., Njeru P.M., Ndiege I.O., Hassanali A., "Repellency of essential oils of some plants from the Kenyan coast against *Anopheles gambiae*," *Acta Tropica* 2005; 95:210-218.
- [226] Park B.S., Choi W.S., Kim J.H., Kim K.H., Lee S.E., "Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents," *Journal of the American Mosquito Control Association* 2005; 21:80-83.
- [227] Maia M.F., Moore S.J., "Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing," *Malaria Journal* 2011; 10:1-15.
- [228] Choi W.S., Park B.S., Ku S.K., Lee S.E., "Repellent activities of essential oils and monoterpenes against *Culex pipiens pallens*," *Journal of American Mosquito Control Association* 2002; 18:348-351.
- [229] Dugassa S., Grimay M., Balkew M., Seyoum A., Gebre-Michael T., "Field investigation on the repellent activity of some aromatic plants by traditional means against *Anopheles arabiensis* and *An. pharoensis* (Diptera: Culicidae) around Koka, central Ethiopia," *Acta Tropica* 2009; 112:38-42.
- [230] Jantan I., Zaki M., "Development of environment-friendly insect repellents from the leaf oils of selected Malaysian plants," *ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation*

- (ARBEC) 1998; 1-7.
- [231] Chang K.S., Tak J.H., Kim S.L., Lee W.J., Ahn Y.J., "Repellency of *Cinnamomum cassia* bark compounds and cream containing cassia oil to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory and indoor conditions," *Pest Management Science* 2006; 62:1032-1038.
- [232] Batish D.R., Singh H.P., Kohli R.K., Kaur S., "Eucalyptus essential oil as a natural pesticide," *Forest Ecology and Management* 2008; 256:2166-2174.
- [233] Choochote W., Chaithong U., Kamsuk K., Jitpakdi A., Tippawangkosol P., Tuetun B., Champakaew D., Pitasawat B., "Repellent Activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*," *Fitoterapia* 2007; 78:359-364.
- [234] Ibrahim M.A., Kainulainen P., Aflatuni A., Tiilikkala K., Holopainen J.K., "Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests," *Agricultural and Food Science in Finland* 2001;10:243-259.
- [235] Jaenson T.G.T., Palsson K., Borg-Karlson A.K., "Evaluation of extracts and oils of mosquito (Diptera:Culicidae) repellent plants from Sweden and Guinea-Bissau," *Journal of Medical Entomology* 2006; 43:113-119.
- [236] Nentwig G., "Use of repellents as prophylactic agents," *Parasitology Research* 2003; 90:40-48.
- [237] Brown M., Hebert A.A., "Insect repellents: an overview," *Journal of American Academy of Dermatology* 1997; 36:243-249.
- [238] Nerio L. S., Olivero-Verbel J. and Stashenko E., "Repellent activity of essential oils: A review," *Bioresourse Technology* 2010; 101:272-378.
- [239] Duke J. A., "Plant parts with Insect-repellent activity from the chemical borneol," *Phytochemical and Ethnobotanical Databases*, no. <<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/chemact.pl?INSECT-REPELLENT+BORNEOL>> consultado a 21-01-13.
- [240] Maia M. F. and Moore S. J., "Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing," *Malaria Journal* 2011;10:1-15.
- [241] Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., Scheffer J.J.C., "Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils," *Flavour and Fragrance Journal* 2008; 23:213-226.

- [242] Armbruster W.S., Howard J.J., Clausen T.P., Debevec E., Loquvan J., Matsuki M., Cerendolo B., "Do biochemical exaptations link evolution of defense and pollination systems Historical hypotheses and experimental tests with *Dalechampia Vines*," *American Naturalist* 1997; 149:461-484.
- [243] Dudareva N., Pichersky E. and Gershenzon J., "Biochemistry of plant volatiles," *Plant Physiology*, 2004; 135:1893-1902.
- [244] Wink M., "Biochemistry of plant secondary metabolites," *Annual Plant Reviews* 2010, Volume 40, Second Edition, pp. 1-303,.
- [245] Dudareva N. and Pichersky E., "Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents," *Plant physiology* 2000; 122:627-633.
- [246] Bouwmeester H. J., Gershenzon J., Konings M. C. J. M. and Croteau R., "Biosynthesis of the monoterpenes Limonene and carvone in the fruit of Caraway," *Plant Physiology* 1998; 117:901-912.
- [247] Gershenzon J., McConkey M. E. and Croteau R. B., "Regulation of monoterpenes accumulation in leaves of peppermint," *American Society of Plant Physiologists* 2000; 122: 205-214.
- [248] Gang D.R., "Evolution of flavors and scents," *Annual Review Plant Biology* 2005; 56:301-325.
- [249] Araújo M.E.M., "Química Analítica Aplicada aos Produtos Naturais," Tese de Mestrado em Química Analítica Aplicada 2005.
- [250] Jakobsen H.B., Olsen C.E., "Influence of climatic factors on emission of flower volatiles in situ," *Biomedical and Life Sciences* 1994; 192:365-371.
- [251] Helsper J. P.F.G., Davies J.A., Bouwmeester H.J., Krol A.F., Kampen M.H., "Circadian rhythmicity in emission of volatile compounds by flowers of *Rosa hybrida* L. cv. Honesty," *Planta* 1998; 207:88-95.
- [252] Zouari N., Ayadi I., Fakhfakh N., Rebai A., Zouari S., "Variation of chemical composition of essential oils in wild populations of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut., a North African endemic species," *Lipids Health Disease* 2012; 11:2-12.
- [253] Echeverrigaray S., Fracaro F., Santos A.C.A., Paroul N., Wasum R., Serafini L.A., "Essential oil composition of south Brazilian populations of *Cunila galioides* and its relation with the geographic distribution," *Biochemical Systematics and Ecology* 2003; 31:467-475.
- [254] Regnault-Roger C., "The potential of botanical essential oils for insect pest control," *Integrated Pest Management Reviews* 1997; 2:25-34.

- [255] Cseke L. S., Kirakosyan A., Kaufman P. B., Warber S. L., Duke J. A. and Brielmann H. L., "Natural products from plants," *Taylor & Francis* 2006; Second edition, 8:264-313.
- [256] Kim K. K. and Verpoorte R., "Sample preparation for plant metabolomics," *Phytochemical Analysis* 2010; 21:4-13.
- [257] Ormeño E., Goldstein A., Niinemets Ü., "Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stored in plant species," *Trends in Analytical Chemistry* 2011; 30:978-989.
- [258] Romanik G., Gilgenast E., Przyjazny A. and Kaminski M., "Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis," *Journal of Biochemical and Biophysical methods* 2007; 70:253-261.
- [259] Cuevas-Glory L.F., Pino J.A., Santiago L.S., Sauri-Duch E., "A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey," *Food Chemistry* 2007; 103:1032-1043.
- [260] Arthur C.L., Pawliszyn J., "Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers," *Annual Chemistry* 1990; 62:2145-2148.
- [261] Kataoka H., Lord H.L., Pawliszyn J., "Applications of solid-phase microextraction in food analysis," *Journal of Chromatography A* 2000; 880:35-62.
- [262] Pinto M.M.M., "Manual de Trabalhos Laboratoriais de Química Orgânica e Farmacêutica," *LIDEL* 2011; 116-123.
- [263] McMaster M.C., "GC/MS A Practical User's Guide 2008; Secon Edition".
- [264] Robinson A. S., "Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes.," *Genetica* 2002; 116:5-13.
- [265] Caceres C., "Mass rearing of temperature sensitive genetic sexing strains in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*).," *Genetica* 2002; 116:107-116.
- [266] Bouwmeester H. J., Gershenzon J., Konings M. C. J. M. and Croteau R., "Biosynthesis of the monoterpenes Limonene and carvone in the fruit of Caraway," *Plant Physiology* 1998; 117: 901-912.
- [267] Gershenzon J., McConkey M. E. and Croteau R. B., "Regulation of monoterpenes accumulation in leaves of peppermint," *American Society of Plant Physiologists* 2000; 122: 205-214.
- [268] Wink M., "Biochemistry of plant secondary metabolis," *Anuul Plant Reviews* 2010, *Second Edition*,

- volume 40, pp. 1-303.
- [269] Sequeira M. M., Fontinha S., Ramos L. and Mateus M. G., "Plantas e usos tradicionais nas memórias de hoje.," *Casa do povo da ilha de Santana*, 2006.
- [270] Hammad E.M.A.F., Zournajian H., Talhouk S. , "Efficacy of extracts of *Melia azedarach* L. callus, leaves and fruits against adults of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* (Hom., Aleyrodidae)," *Journal of Applied Entomology* 2001; 125:483-488.
- [271] Demas F. A., Hassanali A., Mwangi E. N., Kunjeku E. C. and Mabveni A. R., "*Cattle* and *Amblyomma variegatum* odors used in host habitat and host finding by the tick parasitoid, *Isodiphagus hookeri*," *Chemical Ecology* 2000; 26:1027-1093.
- [272] Koschier E. H., Kogel W. J. D. and Visser J. H., "Assessing the attractiveness of volatile plant compounds to western flower thrips *Frankliniella occidentalis*," *Chemical Ecology* 2000; 26: 2643-2655.
- [273] George D. R., Sparagano O. A., Port G., Okello E., Shiel R. S. and Guy J. H., "Repellence of plant essential oils to *Dermanyssus gallinae* and toxicity to the non-target invertebrate *Tenebrio molitor*," *Veterinary Parasitology* 2009; 162:129-134.
- [274] Jang E. B., Raw A. S. and Carvalho L. A., "Field attraction of mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) to synthetic stereoselective enantiomers of the ceralure B1 isomer," *Journal of Chemical Ecology* 2001; 27:235-242.
- [275] Alfaro C., Vacas S., Zarco M., Navarro-Llopis V. and Primo J., "Solid phase microextraction of volatile emissions of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae): influence of fly sex, age and mating status.," *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011; 59:298-306.
- [276] Ascoli A. and Albert P. J., "Orientation Behavior of Second-Instar Larvae of Eastern Spruce Budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae) in a Y-Type Olfactometer," *Journal of Chemical Ecology* 1985; 11.
- [277] Ayres M., Jr.Ph.D.M.A., Ayres D.L.; Santos A.A.S, "BioEstat; Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Bio-médicas," 2003; 1-302.
- [278] Acree T; Arn H., "Flavornet and human odor space <<http://www.flavornet.org/index.html>> Consultado: 5-20 de Abril de 2013".

- [279] El-Sayed A., "The pherobase: Database of pheromones and semiochemicals <<http://www.pherobase.com/>> consultado de 5-20 de Abril de 2013".
- [280] Chang C.L., Cho, I. K., Li Q. X., "Insecticidal activity of basil oil, trans-anethole, estragole and linalool to adult fruit flies of *Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis* and *Bactrocera cucurbitae*," *Economic Entomology* 2009; 102: 203-209.
- [281] Passino G.S., Bazzoni E., Moretti M. D.L., Prota R., "Effects of essential oil formulations on *Ceratitis capitata* Wied. (Dipt., Tephritidae) adult flies," *Applied Entomology* 1999; 123:145-149.
- [282] Gothilf S., Galun R., "Olfactometer and trap for evaluating attractants for the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*," *Phytoparasitica* 1982; 10:79-84..
- [283] Geier M., Bosch O. J., Boeckh J., "Ammonia as an Attractive Component of Host Odour for the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*," *Chemical Senses* 1999; 24:647-653.
- [284] Geier M.; Bosch O.J.; Boeckh J., "Influence of odour plume structure on upwind flight of mosquito towards hosts," *Journal of Experimental Biology* 1999; 202:1639-1648.
- [285] Koschier E. H., Jan De Kogel W. and Visser J. H., "Assessing the attractiveness of volatiles plant compounds to western flower thrips *Frankliniella occidentalis*," *Journal of Chemical Ecology* 2000, 26:2643-2655,.
- [286] Kudon L.H., Berisford C.W., "An olfactometer for bark beetle parasites," *Journal of Chemical Ecology* 1981; 359:366.
- [287] Blackmer J.L., Rodriguez-Saona C., Byers J.A., Shope K.L., Smith J.P., "Behavioral response of *Lygus herperus* to conspecifics and headspace volatiles of alfalfa in a Y-tube olfactometer," *Journal of Chemical Ecology* 2004; 30:1547-1564.
- [288] Vet L.E.M, Lenteren J.C.V., Heymans M., Meelis E., "An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects," *Physiological Entomology* 1983; 8:97-106.
- [289] Prosen H., Zupancic-Kralj L., "Solid-phase microextraction," *Trends in Analytical Chemistry* 1999; 18:272-281.
- [290] Mazor M., Peysakhis A. and Reuven G., "Release rate of ammonia - a Key component in the attraction of female mediterranean fruit fly to protein-based food lures.," *IOBC wprs Bulletin* 2002;

25: 1-6.

- [291] Oluwafemi S., Bruce T.J.A., Pickett J.A., Ton J., Birkett M.A., "Behavioral responses of the Leafhopper, *Cicadulina storeyi* China, a major vector of maize streak virus, to volatile cues from intact and leafhopper-damaged maize," *Journal of Chemical Ecology* 2011; 37:40-48.
- [292] Wasserman S.L., Itagaki H., "The olfactory responses of the antenna and maxillary palp of the fleshfly, *Neobellieria bullata* (Diptera:Sarcophagidae), and their sensitivity to blockage of nitric oxide synthase," *Journal of Insect Physiology* 2003; 49:271-280.
- [293] Chabaud M.A., Preat T., Kaiser L., "Behavioral characterization of individual olfactory memory retrieval in *Drosophila melanogaster*," *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 2010; 4:1-11.
- [294] Krugner R., Johnson M.W., Daane K.M., Morse J.G., "Olfactory responses of the egg parasitoid, *Gonatocerus ashmeadi* girault (Hymenoptera:Mymaridae) to host plants infested by *Homalodisca vitripennis* (Germar) (Hemiptera:Cicadellidae)," *Biological Control* 2008; 48:8-15.
- [295] Rousse P., Duyck P.F., Quilici S., Ryckewaert P., "Adjustment of field cage methodology for testing food attractants for fruit flies (Diptera:Tephritidae)," *Annual Entomological Society* 2005; 98:402-408.
- [296] Robacker D.C. , "Effects of food deprivation, age, time of day and gamma irradiation on attraction of mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae) to two synthetic lures in a wind tunnel," *Physiological and Chemical Ecology* 1998; 27: 1303-1309.
- [297] Morton T.C., Bateman M.A., "Chemical studies on proteinaceous attractants for fruit flies, including the identifications of volatile constituents," *Australian Journal of Agricultural Research* 1981; 32:905-916.
- [298] Buttery R.G., Ling L.C., Teranishi R., Mon T.R., "Insect attractants: volatiles of hydrolyzed protein insect baits," *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1983; 31:689-692.
- [299] Matsumoto K.E., Buttery R.G., Flath R.A., Mon T.R., Teranishi R., "Protein hydrolysate volatiles as insect attractants," *ACS Symposium Series* 1985; 25:353-366.
- [300] Flath R.A., Matsumoto K.E., Binder R.G., Cunningham R.T., Mon T.R., "Effect of pH on the volatiles of hydrolyzed protein insect baits," *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1989; 37:814-819.
- [301] Lee C.J., DeMilo A.B., Moreno D.S., Mangan R.L., "Identification of the volatile components of E802 *Mazoferm Steepwater*, a condensed fermented corn extractive highly attractive to the mexican fruit

- fly (Diptera:Tephritidae)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997; 45:2327-2331.
- [302] Vargas R.I., Miller N.W., Prokopy R.J., "Attraction and feeding responses of Mediterranean fruit fly and a natural enemy to protein baits laced with teo toxins, phloxine B and spinosad," *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2002; 102:273-282.
- [303] Barry J.D., Vargas R.I., Miller N.W., Morse J.G., "Feeding and foraging of wild and sterile Mediterranean fruit flies (Diptera:Tephritidae) in the presence of Spinosad bait," *Journal of entomology* 2003; 96:1405-1411.
- [304] Günaldin K., Savci S., "Phytochemical studies on *Ruta Chalepensis* (LAM.) Lamarck," *Natural Product Research* 2005; 19:203-210.
- [305] Conti B., Leonardi M., Pistelli L., Profeti R., Ouerghemmi L., Benelli G., "Larvicidal and repellent activity of essential oils from wild and cultivated *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) against *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae), and arbovirus vector," *Parasitology Research* 2012.
- [306] Coen M., Engel R., Nahrstedt A., "Chavicol β -D-Glucoside, a phenylpropanoid heteroside, benzyl- β -D-glucoside and glycosidically bound volatiles from subspecies of *Cedronella canariensis*," *Phytochemistry* 1995; 40:149-155.
- [307] Paz P.L.P., Alonso M.J.P., Negueruela A.V., Pinilla M.G., Vallejo C.G., Esteban J.L., "Variación morfológica y aceites esenciales de *Cedronella Canariensis* (L.) Webb & Berthel (Labiatae)," *Anales Jardín Botánico de Madrid* 1996; 54:303-306.
- [308] Damjanovic-Vratnica B., Dakov R., Sukovic D., Damjanovic J., "Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill from Montenegro," *Czech Journal of Food* 2011; 29:277-284.
- [309] Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R., "Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials on foods," *Food Chemistry* 2005; 91: 621-632.
- [310] Rodilla J.M., Tinoco M.T., Morais J.C., Gimenez C., Cabrera R., Martín-Bentio D., Castillo L., Gonzalez-Coloma A., "*Laurus novocanariensis* essential oil: Seasonal variation and valorization," *Biochemical Systematics and Ecology* 2008; 36:167-176.
- [311] Macchioni F., Perrucci S., Cioni P., Morelli I., Castilho P., Cecchi F., "Composition and acaricidal activity of *Laurus novocanariensis* and *Laurus nobilis* essential oils against *Psoroptes cuniculi*,"

Journal of Essential Oil Research 2006; 18:111-114.

- [312] Flamini G., Cioni P.L., Morelli I., Maccioni S., Baldini R., "Phytochemical typologies in some populations of *Myrtus communis* L. on caprione promontory (East Liguria, Italy)," *Food Chemistry* 2004; 85:599-604.
- [313] Pereira P.C., Cebola M.J., Bernardo-Gil M.G., "Evaluation of the yields and composition of essential oil from portuguese myrtle (*Myrtus comunis* L.) through the vegetative cycle," *Molecules* 2009; 14:3094-3105.
- [314] Rustaiyan A., Khosravi M., Lotfabadi F.S., Yari M., Masoudi S., Monfared A., "Constituents of the essential oil of *Ruta chalepensis* L. from Iran," *Journal of Essential Oil Research* 2002; 14:378-379.
- [315] Gonçalves G.B., Silva C.E., Santos J.C.G., Santos E.S., Nascimento R.R., Silva E.L., Mendonça A.L., Freitas M.R.T., Sant'Ana A.E.G., "Comparison of the volatile components released by calling males of *Ceratitis capitata* (Diptera:Tephritidae) with those extractable from the salivary glands," *Florida Entomological Society* 2006; 89:375-379.
- [316] Mavraganis V.G., Liaropoulos C., Papadopoulos N.T., Kouloussis N.A., Broumas T., "Whole body extract of Mediterranean fruit fly male elicit high attraction in virgin females," *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2008; 127:20-29.

ANEXOS

Anexo 1: Composição química da proteína alimentar FNI210 (Bio-Ingredientes LaLLEMAND) utilizada na alimentação dos adultos (Chang, 2009).

Proteína FNI210						
Aminoácido (g/100g)		Vitaminas (mg/100g)		Minerais (mg/100g)		Proteína (%)
Alanina	6,7	Biotina	0,07	Cálcio	187	65-70
Arginina	3,9	Ácido Fólico	2,8	Cobre	1,2	
Ácido Aspártico	4,7	Inositol	130	Ferro	11,9	
Ácido Glutâmico	6,4	Niacina	12,9	Magnésio	70,6	
Glicina	4,2	Ácido Pantotênico (B5)	3,1	Manganês	2,2	
Histidina	3,1	Riboflavina (B2)	4,6	Fósforo	876	
Isoleucina	6,9	Tiamina (B1)	3,5	Potássio	1930	
Leucina	11,7			Sódio	845	
Lisina	7,7			Zinco	10,6	
Metionina	2,7					
Fenilalanina	6,3					
Serina	5,6					
Treonina	6,1					
Tirosina	3,3					
Triptofano	2,4					
Valina	7,2					

Anexo 2: Respostas dos insetos à proteína alimentar FNI 210 obtidas na primeira repetição de cada um dos bioensaios somadas de acordo com as condições dos insetos (sexo, estado sexual, idade e número de indivíduos por grupo) e braço onde foi colocada a amostra (D=direito ou E=esquerdo) ao longo do tempo (10, 20 ou 30 minutos). RP=resposta positiva, RN=resposta negativa e NR=não resposta.

Condições dos Insetos			Braço Olfact. c/amostra	Tempo (mint)								
Sexo/ Est. Sex.	Idade (dias)	N.º por Grupo		10			20			30		
			RP	RN	NR	RP	RN	NR	RP	RN	NR	
♂NV	5 dias	5	D	4	2	9	4	0	11	4	0	11
			E	3	2	10	4	1	10	4	1	10
		10	D	5	7	18	7	7	16	7	5	18
			E	7	4	19	9	6	15	10	6	14
		15	D	12	1	32	12	1	32	12	2	31
			E	12	4	29	14	5	26	14	6	25
	8 dias	5	D	7	0	8	8	0	7	9	0	6
			E	4	0	11	4	0	11	5	0	10
		10	D	8	2	20	9	4	17	12	5	13
			E	9	4	17	9	7	14	11	7	12
		15	D	12	3	30	15	3	27	15	4	26
			E	8	5	32	12	6	27	16	6	23
	14 dias	5	D	4	0	11	5	0	10	4	1	10
			E	2	0	13	4	0	11	4	0	11
		10	D	3	3	24	7	4	19	8	3	19
			E	6	4	20	8	4	18	9	3	18
		15	D	6	5	34	11	5	29	13	5	27
			E	11	0	34	13	1	31	13	2	30
	20 dias	5	D	2	2	11	2	2	11	2	2	11
			E	2	2	11	2	3	10	2	2	11
		10	D	3	1	26	6	0	24	5	0	25
			E	5	0	25	6	2	22	6	2	22
		15	D	9	6	30	8	5	32	8	5	32
			E	10	2	33	9	5	31	8	3	34
♀V	5 dias	5	D	7	2	6	9	2	4	9	2	4
			E	7	3	5	7	4	4	8	4	3
		10	D	10	7	13	10	7	13	10	6	14
			E	10	6	14	9	7	14	9	7	14
		15	D	14	2	29	15	6	24	15	6	24
			E	13	6	26	16	4	25	16	6	23
	8 dias	5	D	5	1	9	7	2	6	7	2	6
			E	8	2	5	8	1	6	9	0	6
		10	D	13	2	15	15	4	11	12	7	11
			E	9	2	19	11	2	17	13	3	14
		15	D	14	3	28	16	1	28	17	1	27
			E	16	1	28	14	4	27	15	3	27
	14 dias	5	D	9	1	5	8	1	6	8	2	5
			E	6	3	6	6	4	5	5	2	8
		10	D	9	1	20	11	2	17	12	3	15
			E	9	1	20	12	2	16	13	2	15
		15	D	9	1	35	7	3	35	7	3	35
			E	10	2	33	10	3	32	11	2	32
	20 dias	5	D	1	1	13	2	1	12	2	1	12
			E	1	0	14	3	0	12	4	0	11
		10	D	3	3	24	3	4	23	3	3	24
			E	3	1	26	4	3	23	6	3	21
		15	D	5	3	37	2	6	37	5	4	36
			E	3	2	40	10	2	33	7	5	33

Anexo 2 (continuação): Respostas dos insetos à proteína alimentar FNI 210 obtidas na primeira repetição de cada um dos bioensaios somadas de acordo com as condições dos insetos (sexo, estado sexual, idade e número de indivíduos por grupo) e braço onde foi colocada a amostra (D=direito ou E=esquerdo) ao longo do tempo (10, 20 ou 30 minutos). RP=resposta positiva, RN=resposta negativa e NR=não resposta.

Condições dos Insetos			Braço Olfact. c/amostra	Tempo (mint)								
Sexo/ Est. Sex.	Idade (dias)	N.º por Grupo		10			20			30		
			RP	RN	NR	RP	RN	NR	RP	RN	NR	
♀NV	5 dias	5	D	7	2	6	9	2	4	9	2	4
			E	7	3	5	7	4	4	8	4	3
		10	D	8	8	14	10	6	14	11	6	13
			E	11	4	15	9	6	15	9	6	15
		15	D	14	4	27	16	2	27	17	1	27
			E	12	1	32	12	3	30	13	2	30
	8 dias	5	D	8	2	5	8	1	6	9	0	6
			E	6	1	8	8	1	6	9	1	5
		10	D	13	2	15	15	4	11	14	5	11
			E	9	2	19	11	2	17	13	3	14
		15	D	15	1	29	16	0	29	18	1	26
			E	16	1	28	13	5	27	14	5	26
	14 dias	5	D	6	3	6	6	3	6	7	4	4
			E	6	1	8	7	2	6	6	2	7
		10	D	10	5	15	10	5	15	13	4	13
			E	7	2	21	10	2	18	11	3	16
		15	D	10	4	16	10	5	15	13	4	13
			E	7	2	21	10	2	18	11	3	16
	20 dias	5	D	2	0	13	3	0	12	3	0	12
			E	1	0	14	3	1	11	3	1	11
		10	D	4	0	26	3	2	25	4	2	24
			E	2	4	24	3	5	22	4	4	22
		15	D	4	3	38	5	4	36	6	3	36
			E	5	2	38	4	3	38	4	5	36

Anexo 3: Respostas dos insetos obtidas nos bioensaios com as plantas somadas de acordo com as condições dos insetos (sexo, estado sexual) ao longo do tempo (10, 20 ou 30 minutos). RP=resposta positiva, RN=resposta negativa e NR=não resposta.

Bioensaios	Sexo/Est. Sex.	Tipo de Amostra no Olfac.	Tempo (mint)								
			10			20			30		
			RP	NR	RN	RP	NR	RN	RP	NR	RN
<i>R. chalepensis</i>	♂V	Branco	6	30	4	7	29	4	7	28	5
		Proteína	12	25	3	16	18	6	17	17	6
		Extrato	10	27	3	10	27	3	11	26	3
	♀V	Branco	9	17	14	9	17	14	9	17	14
		Proteína	17	15	8	20	14	6	21	14	5
		Extrato	13	17	10	16	13	11	15	14	11
	♀NV	Branco	5	31	4	5	31	4	5	32	3
		Proteína	15	21	4	15	21	4	15	20	5
		Extrato	6	23	11	7	20	13	8	19	13
<i>C. canariensis</i>	♂V	Branco	7	30	3	8	30	2	7	30	3
		Proteína	17	21	2	20	19	1	20	19	1
		Extrato	16	20	5	17	18	5	17	18	5
	♀V	Branco	5	27	8	6	24	10	9	20	11
		Proteína	15	19	6	21	12	7	21	12	7
		Extrato	12	17	11	13	15	12	13	15	12
	♀NV	Branco	6	27	7	6	27	7	6	26	8
		Proteína	15	24	1	17	22	1	18	21	1
		Extrato	11	23	6	12	22	6	12	22	6
<i>E. globulus</i>	♂V	Branco	3	34	3	7	30	3	8	27	5
		Proteína	7	31	2	8	29	3	10	27	3
		Extrato	15	22	4	17	20	4	17	17	7
	♀V	Branco	12	18	10	13	17	10	13	17	10
		Proteína	18	16	6	22	12	6	24	11	5
		Extrato	15	17	7	18	14	8	18	14	8
	♀NV	Branco	4	31	5	4	32	5	5	28	7
		Proteína	12	24	3	19	19	2	22	17	1
		Extrato	11	24	5	11	23	7	11	21	8
<i>L. novocanariensis</i>	♂V	Branco	6	32	2	8	27	5	12	23	5
		Proteína	14	20	6	16	15	9	16	15	9
		Extrato	13	26	1	19	18	3	19	18	3
	♀V	Branco	10	23	7	10	22	8	10	22	8
		Proteína	19	14	7	22	13	5	23	13	4
		Extrato	9	21	8	15	15	10	15	14	11
	♀NV	Branco	6	25	9	8	24	8	9	23	8
		Proteína	15	22	3	21	13	6	22	12	6
		Extrato	12	22	6	18	17	5	19	15	6
<i>M. communis</i>	♂V	Branco	4	31	5	4	31	5	4	31	5
		Proteína	16	20	3	21	16	2	22	15	2
		Extrato	13	25	2	15	20	5	15	20	5
	♀V	Branco	9	26	5	9	26	5	8	26	6
		Proteína	19	20	1	24	12	4	25	10	5
		Extrato	14	20	6	18	15	7	19	12	9
	♀NV	Branco	5	32	3	5	27	8	5	26	9
		Proteína	13	21	6	17	20	3	19	18	3
		Extrato	12	21	6	14	19	7	14	20	6

Anexo 4: Análise estatística sobre a resposta positiva, negativa e não resposta dos insetos à proteína alimentar após três repetições do mesmo bioensaio.

Interações entre Variáveis	SS	d.f.	F	Valor de p
Respostas Positivas				
Correcção do modelo	2,7x10 ⁵	323	6,442	0,000
Intercepção	1,5x10 ⁶	1	11647,197	0,000
Repetições	46,308	2	0,177	0,838
Repetições*Sexo	98,062	2	0,375	0,687
Repetições*Estado Sexual	6,653	2	3,326	0,975
Repetições*Idade	1573,697	6	1,555	0,156
Repetições*Número de indivíduos por grupo	1146,113	4	2,191	0,068
Repetições*Tempo	355,258	4	0,679	0,607
Repetição*Sexo*Idade	1419,290	6	1,808	0,094
Repetição*Sexo* Número de indivíduos por grupo	989,866	4	1,886	0,110
Repetição*Sexo*Tempo	99,417	4	1,90	0,944
Repetição*Estado Sexual*Idade	612,346	6	0,780	0,585
Repetições*Estado Sexual* Número de indivíduos por grupo	150,960	4	0,289	0,886
Repetição*Estado Sexual*Tempo	110,065	4	0,210	0,933
Repetição*Idade*Número de Indivíduos por grupo	2810,875	12	1,786	0,055
Repetição*Idade*Tempo	793,179	12	0,505	0,912
Repetição* Número de Indivíduos por grupo*Tempo	534,385	8	0,511	0,849
Repetição*Sexo*Idade* Número de Indivíduos por grupo	2045,370	12	1,303	0,210
Repetição * Sexo * Idade* Tempo	938,992	12	0,598	0,845
Repetição*Sexo*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	100,686	8	0,96	0,999
Repetição*Estado Sexual*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	177,846	8	0,170	0,995
Repetição*Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	3060,433	24	0,975	0,497
Repetição*Sexo *Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	771,193	24	0,246	1
Repetição*Estado Sexual*Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	598,148	24	0,191	1
Erro	2,1x10 ⁵	1620		

Anexo 4 (continuação): Análise estatística sobre a resposta positiva, negativa e não resposta dos insetos à proteína alimentar após três repetições do mesmo bioensaio.

Interações entre Variáveis	SS	d.f.	F	Valor de p
Respostas Negativas				
Correcção do modelo	8,8x10 ⁴	323	2,428	0,000
Intercepção	1,8x10 ⁵	1	1631,505	0,000
Repetições	612,487	2	2,701	0,067
Repetições*Sexo	450,429	2	1,986	0,138
Repetições*Estado Sexual	442,0,27	2	1,949	0,143
Repetições*Idade	519,490	6	0,764	0,599
Repetições*Número de indivíduos por grupo	2617,223	4	5,770	0,000
Repetições*Tempo	53,243	4	0,117	0,976
Repetição*Sexo*Idade	1226,320	6	1,803	0,095
Repetição*Sexo* Número de indivíduos por grupo	255,796	4	0,564	0,689
Repetição*Sexo *Tempo	94,890	4	0,209	0,933
Repetição*Estado Sexual*Idade	943,296	6	1,387	0,216
Repetições*Estado Sexual* Número de indivíduos por grupo	150,257	4	0,331	0,857
Repetição*Estado Sexual *Tempo	23,817	4	0,053	0,995
Repetição*Idade*Número de Indivíduos por grupo	4451,943	12	3,272	0,000
Repetição*Idade*Tempo	458,631	12	0,337	0,982
Repetição* Número de Indivíduos por grupo*Tempo	1022,878	8	1,128	0,341
Repetição*Sexo*Idade* Número de Indivíduos por grupo	4808,813	12	3,534	0,000
Repetição * Sexo * Idade* Tempo	647,497	12	0,476	0,930
Repetição*Sexo*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	108,608	8	0,120	0,998
Repetição*Estado Sexual*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	216,152	8	0,238	0,984
Repetição*Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	1532,282	24	0,563	0,956
Repetição*Sexo *Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	1197,154	24	0,440	0,992
Repetição*Estado Sexual*Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	317,524	24	0,117	1
Erro	1,8x10 ⁵	1620		

Anexo 4 (continuação): Análise estatística sobre a resposta positiva, negativa e não resposta dos insetos à proteína alimentar após três repetições do mesmo bioensaio.

Interações entre Variáveis	SS	d.f.	F	Valor de p
Não Respostas				
Correcção do modelo	4,4x10 ⁵	323	6,132	0,000
Intercepção	6,6x10 ⁶	1	29619,437	0,000
Repetições	432,963	2	0,964	0,381
Repetições*Sexo	112,242	2	0,250	0,779
Repetições*Estado Sexual	318,752	2	0,710	0,492
Repetições*Idade	1538,559	6	1,142	0,335
Repetições*Número de indivíduos por grupo	488,262	4	0,544	0,704
Repetições*Tempo	457,442	4	0,509	0,729
Repetição*Sexo*Idade	4262,258	6	3,164	0,004
Repetição*Sexo* Número de indivíduos por grupo	1426,012	4	1,588	0,175
Repetição*Sexo *Tempo	233,031	4	0,260	0,904
Repetição*Estado Sexual*Idade	1533,335	6	1,138	0,337
Repetições*Estado Sexual* Número de indivíduos por grupo	459,818	4	0,512	0,727
Repetição*Estado Sexual *Tempo	98,827	4	0,110	0,979
Repetição*Idade*Número de Indivíduos por grupo	4408,610	12	1,636	0,075
Repetição*Idade*Tempo	710,842	12	0,264	0,994
Repetição* Número de Indivíduos por grupo*Tempo	1758,907	8	0,979	0,450
Repetição*Sexo*Idade* Número de Indivíduos por grupo	6063,914	12	2,252	0,008
Repetição * Sexo * Idade* Tempo	1526,969	12	0,567	0,870
Repetição*Sexo*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	270,784	8	0,151	0,997
Repetição*Estado Sexual*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	1143,244	12	0,424	0,955
Repetição*Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	248,809	12	0,092	1
Repetição*Sexo *Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	3481,118	24	0,646	0,904
Repetição*Estado Sexual*Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	921,321	24	0,171	1
Erro	3,6x10 ⁵	1620		

Anexo 5: Comparação dos valores médios das percentagens de respostas positiva, negativa e não respostas dos machos e fêmeas virgens (V) e não virgens (NV) à proteína alimentar em cada uma das três repetições. Os valores médios foram calculados para bioensaios com indivíduos do mesmo sexo, estado sexual, idade e mesmo número de indivíduos por grupo. **Vermelho:** Valor médio mais alto encontrado dentro de cada repetição; **Negrito:** valor médio mais baixo encontrado dentro de cada repetição

Sexo	Idade	N.º Indivíduos por Grupo	Valores médios Por Repetição									
			Resposta Positiva			Resposta Negativa			Não Respostas			
			1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	
♂ V	5	5	25,5	21,1	36,7	6,7	10,0	7,8	67,8	68,9	55,6	
		10	24,4	17,2	27,8	20,0	12,8	17,2	55,6	70,0	55,0	
		15	28,9	29,3	24,8	7,0	17,8	16,3	63,9	52,9	58,9	
	8	5	41,1	41,1	36,7	14,4	14,4	14,4	58,9	44,4	48,9	
		10	32,2	32,8	35,0	16,1	6,7	11,7	51,7	60,6	53,3	
		15	28,9	31,5	32,2	10,37	7,8	3,7	60,8	60,8	64,0	
	14	5	25,6	21,1	17,8	1,95E-14	4,4	4,4	73,3	74,4	77,8	
		10	22,8	25,6	24,4	11,7	20,0	13,3	65,6	54,4	62,2	
		15	25,1	23,7	24,1	6,7	5,2	2,2	68,1	71,1	73,6	
	20	5	13,3	24,4	15,6	14,4	8,9	6,7	72,2	66,7	77,8	
		10	17,2	17,2	16,1	2,8	3,9	4,4	80,0	78,9	79,4	
		15	19,2	22,9	16,7	9,6	6,3	8,9	71,1	70,8	74,5	
	♀ V	5	5	52,2	40,0	44,4	18,9	32,2	23,3	28,9	28,9	32,2
			10	33,3	37,2	36,7	21,1	16,67	16,7	45,6	46,1	46,7
			15	32,9	33,3	31,5	11,1	11,1	12,6	55,9	55,4	55,8
8		5	45,6	45,6	44,4	8,9	14,4	8,9	45,6	40,0	47,8	
		10	40,6	40,6	37,2	10,6	13,3	12,8	48,9	46,1	50,0	
		15	35,2	37,7	34,4	4,8	2,9	5,9	59,9	60,0	59,7	
14		5	46,7	40,0	38,9	14,4	18,9	22,2	38,9	41,1	38,9	
		10	36,7	37,2	35,0	6,1	11,1	13,9	57,2	51,7	51,1	
		15	20,0	24,1	22,9	5,2	3,7	4,4	74,7	72,2	72,4	
20		5	14,4	12,2	18,9	3,3	10,0	22,2	82,2	77,8	58,9	
		10	12,2	13,3	11,1	9,4	12,2	8,3	78,3	74,4	80,6	
		15	12,9	13,4	15,2	7,0	4,4	8,9	80,6	81,9	75,9	
♀ NV		5	5	52,2	38,9	45,6	18,9	32,2	23,3	28,9	28,9	31,1
			10	32,2	36,1	36,1	20,0	15,0	15,6	47,8	48,9	48,3
			15	31,1	36,7	34,8	4,8	2,9	5,6	64,1	60,3	59,7
	8	5	53,3	46,7	50,0	6,7	14,4	8,9	40,0	38,9	41,1	
		10	41,7	39,4	37,2	10,0	14,4	12,8	48,3	46,1	50,0	
		15	34,1	35,2	36,7	4,8	1,9	4,8	61,1	63,3	58,4	
	14	5	42,2	47,8	40,0	12,8	5,6	5,6	45,0	46,7	54,4	
		10	33,9	31,7	33,9	11,7	9,4	6,1	54,4	58,9	60,0	
		15	23,3	24,4	25,5	4,8	3,7	4,8	71,7	71,8	70,0	
	20	5	16,7	13,3	11,1	2,2	11,1	15,6	81,1	75,6	73,3	
		10	11,1	15,0	11,1	9,4	11,1	7,8	79,4	73,9	81,1	
		15	10,7	13,0	11,8	7,4	6,7	7,8	82,0	80,4	80,3	

Anexo 6: Análise estatística sobre a resposta positiva e negativa dos insetos à proteína alimentar de acordo com o braço do olfatómetro.

Variáveis/Interações	SS	d.f.	F	Valor de p
Respostas Positivas				
Correcção do modelo	1,15x10 ⁵	215	3,875	0,000
Intercepção	5,14x10 ⁵	1	3710,247	0,000
Braços Olfatómetro	235,534	1	1,699	0,193
Braços do Olfac.*Sexo	5,787	1	0,042	0,838
Braços do Olfac.*Estado Sexual	305,581	1	2,204	0,138
Braços do Olfac.*Idade	907,242	3	2,181	0,090
Braços do Olfac.*Número de Indivíduos por grupo	612,631	2	2,209	0,111
Braços do Olfac.*Tempo	62,083	2	0,224	0,799
Braços do Olfac.*Sexo*Idade	1245,962	3	2,995	0,031
Braços do Olfac.*Sexo*Número de indivíduos por grupo	847,685	2	3,057	0,048
Braços do Olfac.*Sexo*Tempo	65,895	2	0,238	0,789
Braços do Olfac.*Estado Sexual*Idade	587,937	3	1,413	0,238
Braços do Olfac.*Estado Sexual*Número de indivíduos por grupo	27,829	2	0,100	0,905
Braços do Olfac.*Estado Sexual*Tempo	43,570	2	0,157	0,855
Braços do Olfac.*Idade* Número de Indivíduos por grupo	861,397	6	1,035	0,401
Braços do Olfac.*Idade*Tempo	239,243	6	0,288	0,943
Braços do Olfac.*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	231,367	4	0,417	0,796
Braços do Olfac.*Sexo*Idade* Tempo	290,072	6	0,349	0,911
Braços do Olfac.*Sexo*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	248,457	4	0,448	0,774
Braços do Olfac.*Estado Sexual*Idade* Número de Indivíduos por grupo*	1962,912	6	2,360	0,030
Braços do Olfac.*Estado Sexual * Número de Indivíduos por grupo*Tempo	442,067	12	0,266	0,994
Braços do Olfac.*Estado Sexual*Idade* Tempo	113,220	6	0,136	0,992
Braços do Olfac.* Idade* Número de Indivíduos por grupo*Tempo	442,067	12	0,266	0,994
Braços do Olfac.*Sexo*Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	389,403	12	0,234	0,997
Braços do Olfac.* Estado Sexual * Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	228,292	12	0,137	1
Erro	5,9x10 ⁴	432		

Anexo 6 (continuação): Análise estatística sobre a resposta positiva e negativa dos insetos à proteína alimentar de acordo com o braço do olfatómetro.

Variáveis/Interações	SS	d.f.	F	Valor de p
Respostas Negativas				
Correcção do Modelo	3,0x10 ⁴	215	1,622	0,000
Intercepção	52439,649	1	594,996	0,000
Braços Olfatómetro	75,589	1	0,858	0,355
Braços do Olfac.*Sexo	14,815	1	0,168	0,682
Braços do Olfac.*Estado Sexual	0,926	1	0,11	0,918
Braços do Olfac.*Idade	683,145	3	2,584	0,053
Braços do Olfac.*Número de Indivíduos por grupo	74,223	2	0,421	0,657
Braços do Olfac.*Tempo	236,123	2	1,340	0,263
Braços do Olfac.*Sexo*Idade	845,267	3	3,197	0,023
Braços do Olfac.*Sexo*Número de indivíduos por grupo	190,741	2	1,082	0,340
Braços do Olfac.*Sexo*Tempo	131,019	2	0,743	0,476
Braços do Olfac.*Estado Sexual*Idade	1164,712	3	4,405	0,005
Braços do Olfac.*Estado Sexual*Número de indivíduos por grupo	36,574	2	0,207	0,813
Braços do Olfac.*Estado Sexual*Tempo	189,506	2	1,075	0,342
Braços do Olfac.*Idade* Número de Indivíduos por grupo	1363,409	6	2,578	0,018
Braços do Olfac.*Idade*Tempo	333,059	6	0,630	0,706
Braços do Olfac.*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	61,545	4	0,175	0,951
Braços do Olfac.*Sexo*Idade* Tempo	143,467	6	0,271	0,950
Braços do Olfac.*Sexo*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	25,926	4	0,074	0,990
Braços do Olfac.*Estado Sexual*Idade* Número de Indivíduos por grupo*	750,257	6	1,419	0,206
Braços do Olfac.*Estado Sexual * Número de Indivíduos por grupo*Tempo	156,790	4	0,445	0,776
Braços do Olfac.*Estado Sexual*Idade* Tempo	197,942	6	0,374	0,895
Braços do Olfac.* Idade* Número de Indivíduos por grupo*Tempo	445,542	12	0,421	0,955
Braços do Olfac.*Sexo*Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	286,008	12	0,270	0,993
Braços do Olfac.* Estado Sexual * Idade*Número de Indivíduos por grupo*Tempo	356,996	12	0,338	0,982
Erro	3,8x10 ⁴	432		

Anexo 7: Comparação dos valores médios das percentagens de respostas positiva e negativa dos machos virgens e fêmeas virgens (V) e não virgens (NV) à proteína alimentar de acordo com o braço do ofatômetro onde foi colocado o atrativo. Os valores médios foram calculados para bioensaios com indivíduos do mesmo sexo, estado sexual, idade e mesmo número de indivíduos por grupo. **Vermelho:** Valores médios com grande diferença entre o braço esquerdo e o braço direito.

Sexo	Idade	N.º Indivíduos por Grupo	Valores médios Por Repetição				
			Resposta Positiva		Resposta Negativa		
			D	E	D	E	
♂ V	5	5	26,7	24,4	4,4	8,9	
		10	20,0	28,9	22,2	17,8	
		15	28,1	29,6	2,9	11,1	
	8	5	53,3	28,9	0,0	0,0	
		10	32,2	32,2	12,2	20,0	
		15	28,9	28,9	7,4	13,3	
	14	5	28,9	22,2	2,2	3,6E-015	
		10	20,0	25,6	11,1	12,2	
		15	22,2	28,1	11,1	2,2	
	20	5	11,1	15,6	13,3	15,6	
		10	15,6	18,9	1,1	4,4	
		15	18,5	20,0	11,8	7,4	
	♀ V	5	5	55,6	48,9	13,3	24,4
			10	35,6	31,1	20,0	22,2
			15	32,6	33,3	10,4	11,8
8		5	35,6	55,6	11,1	6,7	
		10	44,4	36,7	14,4	6,7	
		15	37,0	33,3	3,7	5,9	
14		5	55,6	37,8	8,9	20,0	
		10	35,6	37,8	6,7	5,6	
		15	17,0	22,9	5,2	5,2	
20		5	11,1	17,8	6,7	0,0	
		10	10,0	14,4	11,1	7,8	
		15	11,1	14,8	7,4	6,7	
♀ NV		5	5	55,6	48,9	13,3	24,4
			10	30,0	34,4	22,2	17,8
			15	34,8	27,4	5,2	4,4
	8	5	55,6	51,1	6,7	6,7	
		10	46,7	36,7	12,2	7,8	
		15	36,3	31,8	1,5	8,1	
	14	5	42,2	42,2	17,8	7,8	
		10	36,7	31,1	14,4	8,9	
		15	22,2	24,4	5,2	4,4	
	20	5	17,8	15,6	9,7E-015	4,4	
		10	12,2	10,0	4,4	14,4	
		15	11,1	10,4	7,4	7,4	

Anexo n.º8: Análise estatística obtida pelo teste de Mantel-Haenszel comparando o número de **respostas positivas** dos insetos à proteína alimentar entre o braço direito e o braço esquerdo de machos virgens com fêmeas virgens e de fêmeas virgens com fêmeas não virgens de acordo com a sua idade e número de indivíduos por grupo.

Grupos	Idade (dias)	Variáveis/ Respostas	10 Minutos			20 Minutos			30 Minutos		
			Chi-Squared	df	Asymp.sig (2-sided)	Chi-Squared	df	Asymp.sig (2-sided)	Chi-Squared	df	Asymp.sig (2-sided)
5	5	♀♂ V/V	0,118	1	0,731	0,147	1	0,701	0,036	1	0,849
		♀♀ V/NV	0,890	1	0,641	0,16	1	0,898	0,060	1	0,806
	8	♀♂ V/V	0,205	1	0,651	0,896	1	0,344	0,050	1	0,823
		♀♀ V/NV	0,196	1	0,658	0,039	1	0,843	0,331	1	0,565
	14	♀♂ V/V	0,042	1	0,838	0,000	1	1	0,035	1	0,851
		♀♀ V/NV	0,016	1	0,901	0,109	1	0,741	0,028	1	0,868
20	♀♂ V/V	0,000	1	1	0,778	1	0,378	0,001	1	0,975	
	♀♀ V/NV	0,034	1	0,854	0,013	1	0,909	0,007	1	0,933	
10	5	♀♂ V/V	0,371	1	0,542	0,089	1	0,766	0,042	1	0,838
		♀♀ V/NV	0,232	1	0,630	0,000	1	1	0,050	1	0,823
	8	♀♂ V/V	0,000	1	1	0,096	1	0,757	0,123	1	0,726
		♀♀ V/NV	0,000	1	1	0,023	1	0,880	0,003	1	0,954
	14	♀♂ V/V	0,183	1	0,668	0,067	1	0,796	0,000	1	1
		♀♀ V/NV	0,045	1	0,833	0,147	1	0,702	0,151	1	0,697
20	♀♂ V/V	0,054	1	0,816	0,000	1	1	0,350	1	0,554	
	♀♀ V/NV	0,122	1	0,727	0,069	1	0,792	0,055	1	0,814	
15	5	♀♂ V/V	0,254	1	0,614	0,231	1	0,631	0,273	1	0,601
		♀♀ V/NV	0,114	1	0,735	0,371	1	0,542	0,270	1	0,603
	8	♀♂ V/V	0,031	1	0,860	0,091	1	0,763	0,079	1	0,779
		♀♀ V/NV	0,172	1	0,678	0,000	1	0,989	0,149	1	0,700
	14	♀♂ V/V	0,161	1	0,688	0,008	1	0,929	0,082	1	0,774
		♀♀ V/NV	0,327	1	0,568	0,000	1	1	0,72	1	0,788
20	♀♂ V/V	0,038	1	0,845	0,03	1	0,955	0,100	1	0,752	
	♀♀ V/NV	0,026	1	0,871	0,098	1	0,754	0,100	1	0,752	

Anexo n.º9: Análise estatística obtida pelo teste de Mantel-Haenszel comparando o número de **respostas negativas** dos insetos à proteína alimentar entre o braço direito e o braço esquerdo de machos virgens com fêmeas virgens e de fêmeas virgens com fêmeas não virgens de acordo com a sua idade e número de indivíduos por grupo.

Grupos	Idade (dias)	Variáveis/ Respostas	10 Minutos			20 Minutos			30 Minutos		
			Chi-Squared	df	Asymp.sig (2-sided)	Chi-Squared	df	Asymp.sig (2-sided)	Chi-Squared	df	Asymp.sig (2-sided)
5	5	♀♂ V/V	0,010	1	0,922	2,861	1	0,091	0,012	1	0,914
		♀♀ V/NV	0,094	1	0,759	0,100	1	0,752	0,100	1	0,752
	8	♀♂ V/V	0,177	1	0,674	0,063	1	0,801	0,020	1	0,888
		♀♀ V/NV	0,198	1	0,656	0,194	1	0,660	1,795	1	0,180
	14	♀♂ V/V	0,031	1	0,860	0,027	1	0,869	0,049	1	0,824
		♀♀ V/NV	0,098	1	0,755	0,118	1	0,731	0,194	1	0,660
	20	♀♂ V/V	0,090	1	0,765	0,000	1	1	0,101	1	0,750
		♀♀ V/NV	0,094	1	0,759	0,063	1	0,802	0,156	1	0,693
10	5	♀♂ V/V	0,141	1	0,707	0,007	1	0,932	0,016	1	0,898
		♀♀ V/NV	0,218	1	0,641	0,095	1	0,758	0,039	1	0,843
	8	♀♂ V/V	0,000	1	1	0,045	1	0,833	0,062	1	0,803
		♀♀ V/NV	0,000	1	1	0,127	1	0,721	0,200	1	0,655
	14	♀♂ V/V	0,255	1	0,613	0,255	1	0,613	0,287	1	0,592
		♀♀ V/NV	0,036	1	0,850	0,236	1	0,627	0,093	1	0,760
	20	♀♂ V/V	0,000	1	1	0,254	1	0,614	0,254	1	0,614
		♀♀ V/NV	0,000	1	1	0,172	1	0,678	0,172	1	0,678
15	5	♀♂ V/V	0,069	1	0,793	0,027	1	0,870	0,126	1	0,723
		♀♀ V/NV	0,218	1	0,640	0,383	1	0,536	0,49	1	0,824
	8	♀♂ V/V	0,203	1	0,653	0,476	1	0,490	0,433	1	0,511
		♀♀ V/NV	0,000	1	1	0,476	1	0,490	0,39	1	0,843
	14	♀♂ V/V	0,147	1	0,702	0,236	1	0,627	0,011	1	0,917
		♀♀ V/NV	0,225	1	0,635	0,015	1	0,904	0,318	1	0,573
	20	♀♂ V/V	0,050	1	0,823	0,015	1	0,903	0,187	1	0,666
		♀♀ V/NV	0,050	1	0,823	0,211	1	0,646	0,187	1	0,666

Anexo 10: Análise estatística da resposta positiva dos insetos à proteína alimentar.

Variáveis/Interações	SS	d.f.	F	Valor de p
Correcção do Modelo	1,15x10 ⁵	215	3,875	0,000
Intercepção	5,14x10 ⁵	1	3710,247	0,000
Tempo	3503,784	2	12,635	0,000
Tempo*Sexo	72,685	2	0,262	0,770
Tempo*Estado Sexual	27,829	2	0,100	0,905
Tempo*Idade	480,304	6	0,577	0,748
Tempo*Número de indivíduos por grupo	304,070	4	0,548	0,700
Tempo*Sexo*Idade	735,545	6	0,884	0,506
Tempo*Sexo* Número de indivíduos por grupo	145,370	4	0,262	0,902
Tempo*Estado Sexual*Idade	174,228	6	0,209	0,974
Tempo*Estado Sexual* Número de indivíduos por grupo	188,992	4	0,341	0,850
Tempo*Idade * Número de indivíduos por grupo	707,727	12	0,425	0,953
Tempo*Sexo*Idade * Número de indivíduos por grupo	745,165	12	0,448	0,943
Tempo*Estado Sexual*Idade * Número de indivíduos por grupo	174,383	12	0,105	1
Sexo	4602,083	1	33,192	0,000
Sexo*Idade	4178,884	3	10,047	0,000
Sexo*Número de indivíduos por grupo	3334,722	2	12,026	0,000
Sexo*Idade*Número de indivíduos por grupo	2886,471	6	3,470	0,002
Estado Sexual	0,026	1	0,000	0,989
Estado Sexual*Idade	256,867	3	0,618	0,604
Estado Sexual* Número de indivíduos por grupo	111,163	2	0,401	0,670
Estado Sexual*Idade*Número de indivíduos por grupo	687,809	6	0,827	0,550
Idade	50249,583	3	12,808	0,000
Número de indivíduos por grupo	10243,221	2	36,939	0,000
Idade* Número de indivíduos por grupo	4055,133	6	4,875	0,000
Erro	5,9x10 ⁴	432		

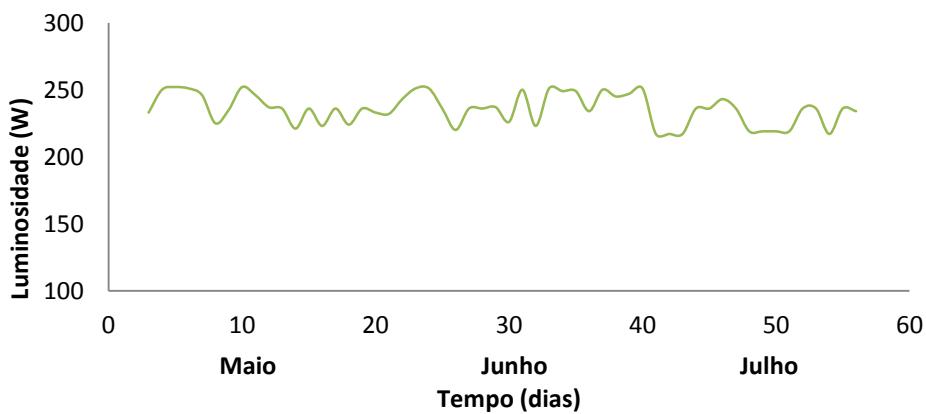
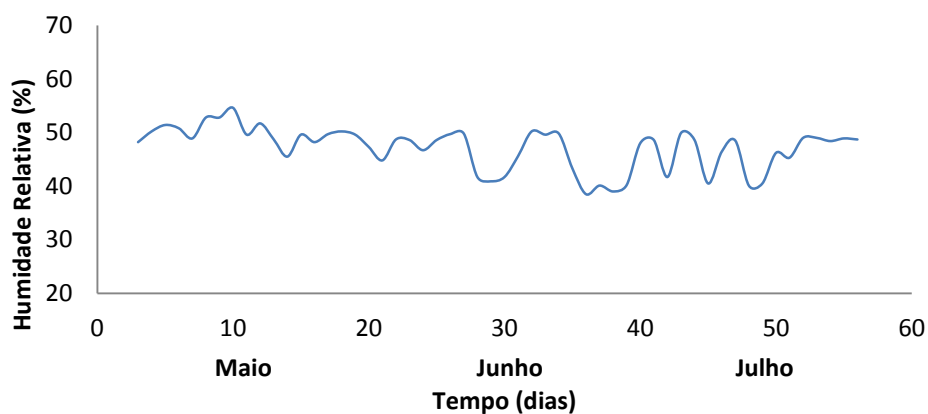
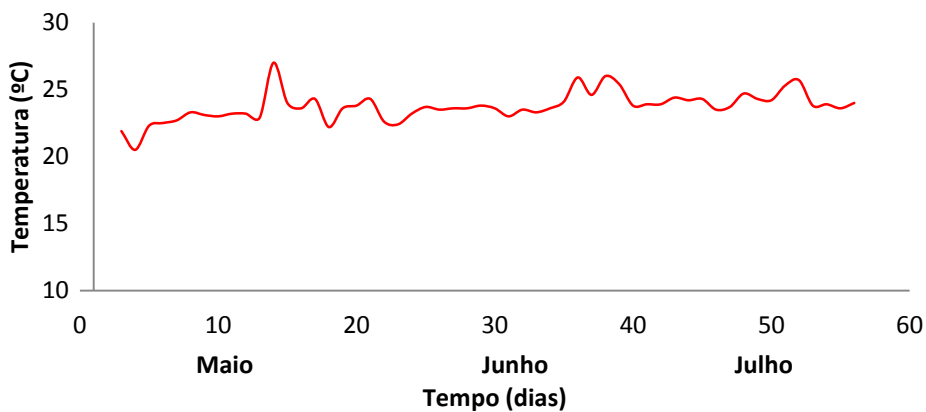
Anexo 11: Análise estatística da resposta negativa dos insetos à proteína alimentar.

Variáveis/Interações	SS	d.f.	F	Valor de p
Correcção do Modelo	3,0x10 ⁴	215	1,622	0,000
Intercepção	52439,649	1	594,996	0,000
Tempo	312,391	2	1,772	0,171
Tempo*Sexo	25,154	2	0,143	0,867
Tempo*Estado Sexual	15,638	2	0,085	0,915
Tempo*Idade	202,286	6	0,383	0,890
Tempo*Número de indivíduos por grupo	269,227	2	1,340	0,263
Tempo*Sexo*Idade	161,265	6	0,305	0,934
Tempo*Sexo* Número de indivíduos por grupo	80,864	4	0,229	0,922
Tempo*Estado Sexual*Idade	183,745	6	0,347	0,911
Tempo*Estado Sexual* Número de indivíduos por grupo	148,868	4	0,422	0,793
Tempo*Idade * Número de indivíduos por grupo	724,734	12	0,685	0,766
Tempo*Sexo*Idade * Número de indivíduos por grupo	469,753	12	0,444	0,945
Tempo*Estado Sexual*Idade * Número de indivíduos por grupo	381,379	12	0,361	0,976
Sexo	156,481	1	1,775	0,183
Sexo*Idade	1034,877	3	3,914	0,009
Sexo*Número de indivíduos por grupo	1162,963	3	3,914	0,002
Sexo*Idade*Número de indivíduos por grupo	3886,420	6	7,349	0,000
Estado Sexual	41,152	1	0,467	0,495
Estado Sexual*Idade	185,391	3	0,701	0,552
Estado Sexual* Número de indivíduos por grupo	138,323	2	0,785	0,457
Estado Sexual*Idade*Número de indivíduos por grupo	366,615	6	0,693	0,655
Idade	3883,602	3	3,914	0,009
Número de indivíduos por grupo	3285,471	2	18,639	0,000
Idade* Número de indivíduos por grupo	3495,187	6	6,610	0,000
Erro	3,8x10 ⁴	432		

Anexo 12: Análise estatística da não resposta dos insetos à proteína alimentar.

Variáveis/Interações	SS	d.f.	F	Valor de p
Correcção do Modelo	1,6x10 ⁵	215	3,641	0,000
Intercepção	2,2x10 ⁶	1	10486,521	0,000
Tempo	5898,388	2	13,685	0,000
Tempo*Sexo	14,969	2	0,035	0,966
Tempo*Estado Sexual	54,372	2	0,126	0,882
Tempo*Idade	819,366	6	0,634	0,703
Tempo*Número de indivíduos por grupo	425,789	4	0,494	0,740
Tempo*Sexo*Idade	1024,130	6	0,792	0,577
Tempo*Sexo* Número de indivíduos por grupo	157,716	4	0,183	0,947
Tempo*Estado Sexual*Idade	280,813	6	0,217	0,971
Tempo*Estado Sexual* Número de indivíduos por grupo	125,874	4	0,146	0,965
Tempo*Idade * Número de indivíduos por grupo	614,740	12	0,238	0,996
Tempo*Sexo*Idade * Número de indivíduos por grupo	1346,037	12	0,520	0,902
Tempo*Estado Sexual*Idade * Número de indivíduos por grupo	698,200	12	0,270	0,993
Sexo	6463,521	1	29,992	0,000
Sexo*Idade	8948,007	3	13,840	0,000
Sexo*Número de indivíduos por grupo	8027,181	2	18,624	0,000
Sexo*Idade*Número de indivíduos por grupo	6677,542	6	1112,924	0,000
Estado Sexual	43,236	1	0,201	0,654
Estado Sexual*Idade	365,098	3	0,565	0,639
Estado Sexual* Número de indivíduos por grupo	106,842	2	0,248	0,781
Estado Sexual*Idade*Número de indivíduos por grupo	956,121	6	0,739	0,618
Idade	64519,509	3	99,794	0,000
Número de indivíduos por grupo	13619,716	2	31,599	0,000
Idade* Número de indivíduos por grupo	6087,454	6	4,708	0,000
Erro	9,3x10 ⁴	432		

Anexo 13: Variação das condições ambientais (temperatura (T°C), percentagem de humidade (%) e luminosidade (lux)) registadas sempre no início de cada bioensaio com proteína alimentar.



Anexo 14: Variação das condições ambientais (temperatura (T°C), percentagem de humidade (%) e luminosidade (lux)) registadas sempre no início de cada bioensaio com branco do olfatómetro, proteína alimentar e extratos das planta.

