

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA GLÂNDULA ABDOMINAL DA FÊMEA DA MARIPOSA *CASTNIA LICUS* (DRURY) (LEPIDOPTERA: CASTNIIDAE); POSSÍVEIS FEROMÔNIOS E PRECURSORES

Lúcia M. C. Rebouças, Maria do S. B. Caraciolo e Antônio E. G. Sant'Ana
Universidade Federal de Alagoas - Depto. de Química - Tabuleiro dos Martins, s/n - 57072-970 - Maceió - AL
John A. Pickett, Lester J. Wadhams e Eleanor M. Pow
IACR - Rothamsted - Harpenden - Hertfordshire - AL 2 JQ - United Kingdom

Recebido em 3/6/98; aceito em 29/3/99

CHEMICAL COMPOSITION FROM FEMALE PHEROMONE GLAND OF *Castnia Licus* (Drury) (LEPIDOPTERA: CASTNIIDAE). The hexane and methanolic extracts from pheromonal glands of *Castnia licus* (Drury) virgin females have been studied. Analyses by gas chromatography and mass spectrometry allowed us to determine the major constituents present in the hexane extract as n-alkanes C₂₁ to C₃₀, (Z)-9-hexadecenoic acid (C₁₆), and (Z)-9-octadecenoic acid (C₁₈) and hexadecanoic acid (C₁₆). Aldehyds, alkenes and acetates were also detected in low concentrations in the extracts. Female pheromone glands were analysed for pheromone precursors using the methanolic extract. In addition to the compounds methyl hexadecanoate and methyl (Z)-9-octadecenoate, the glandular tissue contains a homologous series of methyl esters from C₁₂ to C₂₄. The hexane extract of the female abdominal glands elicited activity from males in a behavioural bioassay.

Keywords: Lepidoptera; *Castnia licus*; and pheromone.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes da região Nordeste do Brasil, constituindo-se para o Estado de Alagoas, em particular, a principal cultura com relevante papel sócio-econômico. Um número considerável de pragas são registradas para a cana-de-açúcar, dentre elas destaca-se a mariposa, *Castnia licus* (Lepidoptera: Castniidae). A revisão mais recente da Família Castniidae foi realizada por Miller em 1972¹ e vários sinônimos são registrados para *C. licus*, entre eles *C. licoides* Boisduval, *Eupalamides licus* (Drury, 1773) e *Leucocastnia licus* (Drury, 1773). A espécie *C. licus* é comum na América Central e América do Sul. No Brasil, é conhecida pelo nome vulgar de "Broca Gigante da Cana-de-Açúcar", "Broca das Bananeiras" e "Lagarta Branca da Cana"^{2,3}.

O ataque aos canaviais por esta praga têm causado grande prejuízo para a economia da indústria açucareira nordestina. O sintoma mais característico do ataque desta praga em canas jovens é a morte do broto terminal conhecido como "coração-morto" e em canas adultas é o amarelecimento da nervura central^{2,3}. A larva da *C. licus* vive no interior da cana e sobrevive de uma safra para outra. A localização da larva dentro do colmo e nas touceiras, após o corte da cana, dificulta o seu controle pelos métodos convencionais com inseticidas e com enxadeco para a catação manual das larvas e pupas.

Os feromônios sexuais de mariposas são conhecidos atualmente para mais de 400 espécies⁴. Em algumas espécies, o feromônio sexual é produzido somente na hora do chamamento sugerindo uma produção regulada e limitada àquele período⁵. Em outras espécies a quantidade do feromônio sexual é estável na glândula durante o período em que a fêmea não se encontra ativa e diminui no período de chamamento, sugerindo uma produção contínua e provavelmente controlada na glândula^{6,7}. Estes feromônios formam um grupo mais ou menos homogêneo de compostos oriundos da rota acetato mevalonato com uma, duas ou três ligações duplas além de grupos funcionais como, acetatos, aldeídos ou álcoois⁴. Os feromônios sexuais de mariposas são produzidos pela fêmea por rotas biossintéticas já demonstradas a partir dos ácidos graxos presentes nos tecidos dos insetos^{8,9}.

Neste trabalho descrevemos os resultados do estudo da composição química da glândula abdominal da fêmea de *C. licus* numa tentativa de determinar o feromônio sexual desta mariposa.

EXPERIMENTAL

Insetos - Os adultos de *C. licus* foram obtidos a partir de casulos coletados nos canaviais das Usinas que fazem parte da Cooperativa dos Usineiros do Estado de Alagoas e pela Associação dos Produtores de Açúcar e álcool do Estado de Alagoas, (ASSUCAL). As pupas macho e fêmeas foram colocadas separadas em caixas plásticas (30 x 6 x 6 cm), forradas com papel toalha e casulos vazios. Estas caixas foram colocadas em gaiolas de madeira (30 x 50 x 50 cm) revestidas com tecido de algodão e mantidas na gaiola do campo. As pupas foram umedecidas diariamente com água e os insetos adultos alimentados com solução de sacarose a 5%.

Extratos Hexânicos e Metanólicos - As fêmeas virgens com 1 a 6 dias de idade ou foram mantidas em fotoperíodo de 12 horas ou mantidas na gaiola de campo. Os oviposidores das fêmeas mantidas em fotoperíodo de 12 horas foram extraídos com solvente após às 2 primeiras horas de luz. As fêmeas mantidas na gaiola de campo foram extraídas após as 5 primeiras horas de luz. No procedimento de extração as fêmeas foram anestesiadas com clorofórmio e com uma leve pressão nos últimos segmentos abdominais o ovipositor foi evertido e cortado nos dois últimos segmentos com ajuda de uma tesoura segundo Klun⁷. Os oviposidores foram colocados em 0,5 mL de hexano recém destilado e extraídos por 30min. O extrato hexânico foi removido e concentrado à 20 µL com nitrogênio gasoso antes da análise por cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Após remoção do hexano, aos oviposidores foram adicionados 0,5 mL de metanol recém destilado e as amostras estocadas a 4°C até serem submetidas a reação de esterificação com BF₃/MeOH.

Atividade do Macho versus Extrato da Fêmea no Olfatômetro - A atividade do macho foi observada em olfatômetro constituindo-se de um sistema de câmaras conectadas entre si e ligadas a uma bomba de vácuo Model-B 100 SE (Figura 1). As observações foram feitas nas 2 primeiras horas de

luz. O extrato hexânico da glândula abdominal de fêmea com 1 a 3 dias de idade, nas concentrações de 0,06EF/10 μ L (3F/500 μ L); 0,08EF/10 μ L(4F/500 μ L) e 1EF/10 μ L(23F/230 μ L) de extrato (EF=Equivalente Fêmea) foram testadas com vazão de ar de 60 cm³/min (19 machos); 160 cm³/min (16 machos) e 180 cm³/min (10 machos). Os extratos (10 μ L) foram aplicados com uma seringa, em um triângulo de papel de filtro de 1cm de lado. O triângulo foi pendurado com um pequeno pedaço de arame e preso ao tecido que fechava a câmara. A cada 30 min, o macho e a amostra do extrato foram trocados. Os movimentos dos machos por regiões da câmara foram registrados e cronometrados. Consideramos como ativo os extratos que atraíram o macho para a região V da câmara (Figura 1) e induziram movimentos de antenas, batimento das asas e vôo em direção a câmara do extrato. O teste em branco desse sistema de bioensaio foi realizado com o hexano (10 μ L).

Esteres Metílicos - Os extratos metanólicos obtidos foram transferidos para vidros de 5 mL e adicionados 1mL de BF₃/MeOH. Os vidros foram fechados e mantidos à temperatura ambiente (27^o - 28^oC) por 24 horas. Após este período adicionou-se água destilada (1 mL) e os ésteres foram extraídos com hexano (1mL)¹⁰. Antes da análise por CG e CG/EM, os extratos hexânicos foram concentrados com nitrogênio gasoso à 200 μ L.

Epoxidação - Em um balão de três bocas (250mL), com condensador de tubo reto sem água de refrigeração e com um frasco coletor (25 mL), foram adicionados água (20 mL), acetona (13 mL) e bicarbonato de sódio (12g). Com auxílio de uma trompa d'água fez-se vácuo e adicionou-se ao balão sulfato de monoperoxido de potássio sólido (25g) seguindo-se de agitação vigorosa à temperatura de 27^o - 28^oC. A solução amarela de dioxirano-acetona foi coletada no frasco resfriado com gelo seco e acetona¹¹. Ao extrato dos ésteres metílicos de fêmeas com 2 dias de idade e aos padrões: 9-octadecenoato de metila e 9-tricoseno foram adicionados a solução dioxirano-acetona (2mL). Após adição da solução de dioxirano-acetona os recipientes foram fechados e mantidos a 4^oC por uma noite. Após a evaporação da acetona com nitrogênio as amostras foram analisadas por CG e CG/EM.

Cromatografia gasosa-Espectrometria de Massa (CG/EM) - A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foi realizada em aparelho VG 5000 com ionização por impacto eletrônico a 70 eV, 230^oC e CG mantido a 30^oC por 5 min com aumento de temperatura programado em 5^oC/min até 180^oC por 15 min. A identificação dos compostos foi efetuada pela interpretação dos espectros de massas e pela comparação com espectros de massas e tempo de retenção de padrões. As análises por CG/EM foram realizadas no laboratório Integrated Approach Crop Research - Rothamsted - Inglaterra.

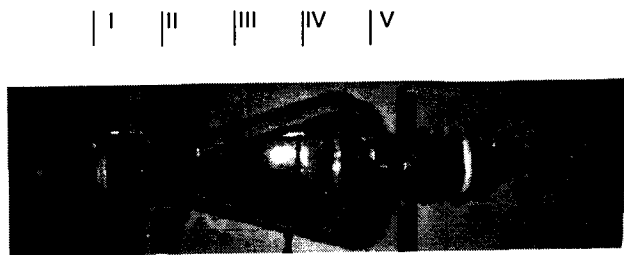


Figura 1. Regiões da câmara do macho no olfátômetro.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os extratos da glândula abdominal da fêmea de *C. licus* com 1 a 3 dias de idade testados no olfátômetro nas concentrações de 0,06EF/10 μ L, 0,08EF/10 μ L e 1EF/10 μ L de extrato e vazões de ar de 60, 160 e 180 cm³/min, mostraram que com

o aumento da concentração aumentou-se a porcentagem de insetos na região V para cada fluxo estudado (Figura 2). Na concentração de 1EF/10 μ L de extrato nas vazões de 60 e 160cm³/min a porcentagem de machos na região V foi em torno de 40% e 75% para as respectivas vazões. Comparando as respostas na mesma vazão (160cm³/min) para os experimentos: macho versus fêmea e macho versus extrato na concentração 1EF observa-se uma porcentagem maior para o extrato do que para a fêmea. Podemos interpretar estes resultados considerando o fato de que a quantidade de feromônio liberada pela fêmea não é constante, ela varia de fêmea para fêmea dentro da mesma espécie¹² e no caso do extrato, temos uma concentração constante. Quando os machos foram observados com o hexano (teste em branco) eles não alcançaram a região V da câmara e permaneceram sem os movimentos considerados de atividade sexual citados abaixo.

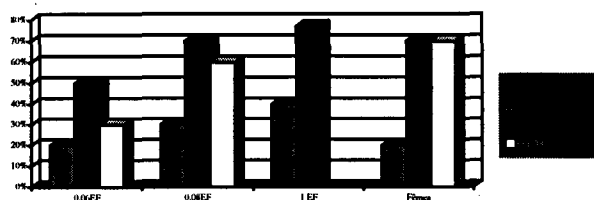


Figura 2. Porcentagem de machos na região V da câmara. Experimentos: macho versus fêmea e macho versus extratos nas concentrações 0,06; 0,08 e 1EF/10 μ L de extratos e vazões de 60,160 e 180cm³/min. (gráfico com 10 repetições por experimento).

A *C. licus* é uma mariposa que apresenta movimentos constantes de batida de asas e mudança de posição, porém o movimento considerado de atividade sexual do macho se distingue do movimento natural do inseto pela duração mais longa dos movimentos, pela presença de movimento das antenas, pela pressão do abdômen nas paredes da câmara e pelos vôos em direção ao extrato.

Os principais picos no cromatograma da corrente iônica total (CIT) (Figura 3) dos extratos hexânicos das fêmeas com 1 até 6 dias de idade foram identificados como os hidrocarbonetos pentacosano (C₂₅) e heptacosano (C₂₇) picos 9 e 13, respectivamente. A série homóloga de *n*-alcanos com C₂₁ até C₃₁ (picos 4, 5, 6, 8, 9, 10, 13 e 15) foi a mesma em todas as amostras das fêmeas com 1 até 6 dias de emergidas mudando somente a proporção relativa entre eles.

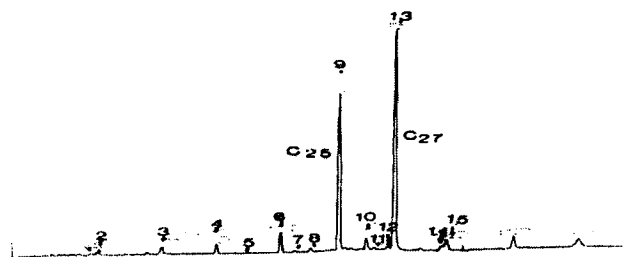


Figura 3. Cromatograma da corrente iônica total (CIT) dos extratos hexânicos da glândula abdominal de *C. licus*.

Os picos 1 e 3 (Figura 3) foram identificados como os ácidos carboxílicos insaturados, ácido (Z)-9-hexadecenóico (C₁₆) e ácido (Z)-9-octadecenóico (C₁₈). Estes ácidos apresentam espectros de massas semelhantes, com pico base em *m/z* 55 (100%). Os fragmentos *m/z* 236 (12%) e *m/z* 264 (28%) são justificados pela perda de água a partir dos respectivos íons

Imoleculares ($M^{+}-18$). O pico 2 foi identificado como o ácido hexadecanóico (C_{16}). O espectro de massas apresentou o íon molecular em m/z 256 (48%) e o pico base em m/z 73 (100%) resultante da quebra da ligação β - γ da cadeia carbônica. O fragmento 60 (88%) comum aos ácidos graxos saturados é justificado pelo rearranjo tipo McLafferty¹³. O espectro de massas do pico 11 apresenta os fragmentos m/z 69 (100%), m/z 41 (28), 81 (48), 95 (16), 121 (12), 137 (24), 149 (8), 191 (8) e 252 (12). Este espectro apresenta boa identidade com o espectro de massas do β -springeno, um diterpeno presente em glândulas de *Bracon heletor*¹⁴. Os compostos identificados nos extratos hexânicos (Figura 3, Tabela 1) estão em quantidade relativamente alta na amostra. Os outros compostos presentes em quantidades relativamente baixas pertencentes às classes dos álcoois insaturados, aldeídos e outros ácidos graxos insaturados, estão em fase de confirmação estrutural e testes para verificação da atividade biológica.

Tabela 1. Compostos presentes na glândula abdominal de fêmeas de *C. licus* com 1 a 6 dias de idade, extratos hexânicos, (CG/EM - CIT- Figura 3).

Picos	Nomenclatura IUPAC
1	ácido (Z)-9-hexadecenóico (C_{16})
2	ácido n-hexadecanóico (C_{16})
3	ácido(Z)-9-octadecenóico+ (Z,Z)-9,12-octadecadienoico(C_{18})
4	heneicosano (C_{21})
5	docosano (C_{22})
6	tricosano (C_{23})
7	tetracosano (C_{24})
8	pentacosano (C_{25})
9	hexacosano (C_{26})
10	β -springeno *
13	heptacosano (C_{27})
15	hentriacontano (C_{31})

* picos 7 e 12 (Figura 3) estão em fase de identificação.

O cromatograma da corrente iônica total (CIT) obtidos por CG/EM (Figura 4), dos extratos metanólicos após esterificação com $BF_3/MeOH$, mostra a presença de uma série homóloga de ésteres graxos de C_{12} a C_{25} (picos 1, 2, 3, 4, 6, 11, 14, 15, 16) e a presença de ésteres de ácidos graxos insaturados com 16, 18 e 20 átomos de carbono (picos 5, 7, 9, 10, 12, 13) (Figura 4 e Tabela 2).

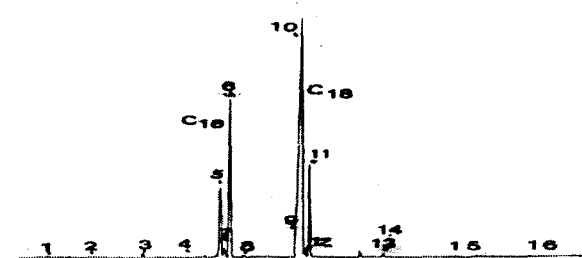


Figura 4. Cromatograma da corrente iônica total (CIT) dos extratos metanólicos da glândula abdominal da fêmea de *C. licus* após esterificação.

Os espectros de massas dos ésteres saturados, mono-insaturados e di-insaturados têm fragmentos característicos. Os ésteres saturados apresentam os fragmentos diagnósticos de ésteres metílicos m/z 74 (pico base) obtido pelo rearranjo do tipo McLafferty e o fragmento m/z 87 obtido pela clivagem b

Tabela 2. Compostos presentes na glândula abdominal de fêmeas de *C. licus* com 1 a 6 dias de idade, extratos metanólicos após esterificação, (CG/EM-CIT - Figura 4).

Picos	Nomenclatura IUPAC
1	dodecanoato de metila
2	tridecanoato de metila
3	tetradecanoato de metila
4	pentadecanoato de metila
5	(Z)-9-hexadecenoato de metila
6	hexadecanoato de metila
7	(Z,Z)-9,12-hexadecadienoato de metila
8	aldeído - hexadecanal
9	(Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metila
10	(Z)-9-octadecenoato de metila
11	octadecanoato de metila
12	(Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoato de metila
13	(Z)-9-eicosenoato de metila
14	eicosanoato de metila
15	docosanoato de metila
16	tetracosanoato de metila

ao grupo carboxílico¹³, como é o caso do espectro de massas por impacto eletrônico do eicosanoato de metila (pico 14) que apresenta os fragmentos m/z 326 (32%) (íon molecular [M^{+}]), 74 (100%), 43 (40), 55 (20), 87 (68), 97 (8), 129 (8), 143 (20), 199 (4), 227(4) e 283 (8). Os ésteres mono insaturados, por sua vez, têm os fragmentos característicos m/z $M^{+}\Sigma - 31$, $M^{+}\Sigma - 32$, $M^{+}\Sigma - 74$, m/z 74 e m/z 55 como pico base. O fragmento m/z 74 nos ésteres mono insaturados tem intensidade relativa média. No espectro de massas do (Z)-9-octadecenoato de metila (pico 10) podemos detectar a presença dos fragmentos característicos [$M^{+}\Sigma$] m/z 296 (8%), $M^{+}\Sigma - 31$ m/z 265 (20), $M^{+}\Sigma - 32$ m/z 264 (38), $M^{+}\Sigma - 74$ m/z 222 (20), m/z 74 (60) e m/z 55 (100).

Os ésteres di-insaturados apresentam os fragmentos m/z $M^{+}\Sigma - 32$, $M^{+}\Sigma - 74$, m/z 74 com baixa intensidade relativa e o pico base em m/z 67. O espectro de massas do (Z,Z)-9-12-octadecadienoato de metila (pico 9) registra a presença dos fragmentos [$M^{+}\Sigma$] m/z 294 (28%), m/z 67 (100), 41 (60), 59 (12), 74 (12), 81 (88), 95 (60), 109 (28), 123 (16), 150 (12), $M^{+}\Sigma - 32$ m/z 262 (4) e $M^{+}\Sigma - 31$ m/z 263 (12). O fragmento m/z 67 pode ser justificado pela quebra da ligação alílica com rearranjo de próton e formação do fragmento [C_5H_7] $^{+}\Sigma$.

A localização da dupla ligação nos carbonos C9-C10 foi determinada pelos derivados epoxidados. O cromatograma da corrente iônica total (CIT) do ésteres após epoxidacão (Figura 5) apresenta um maior tempo de retenção para os compostos epoxidados comparado com os respectivos ésteres insaturados (Figura 4 picos 5 e 10, Tabela 2). Os fragmentos em m/z 127 e em m/z 199 do espectro de massa do (Z)-9,10-epoxi-hexadecanoato de metila (pico 5) e os fragmentos em m/z 155 e m/z 199 do espectro de massa do (Z)-9,10-epoxi-octadecanoato de metila (pico 10) (Figura 6 A e B) correspondem as quebras ao lado do anel epóxido de cada composto, o que permite confirmar a posição da ligação dupla nos carbonos 9 e 10 dos respectivos compostos.

Os compostos identificados até o momento nos extratos hexânicos e metanólicos de *C. licus* (Tabelas 1 e 2) são comuns em tecidos de insetos¹⁵. Os extratos hexânicos da glândula abdominal da fêmea de *C. licus* foram capazes de excitar o macho no olfatômetro em diferentes vazões de ar e concentrações. A atividade do macho foi proporcional ao aumento da concentração do extrato.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, ASSUCAL e Cooperativa

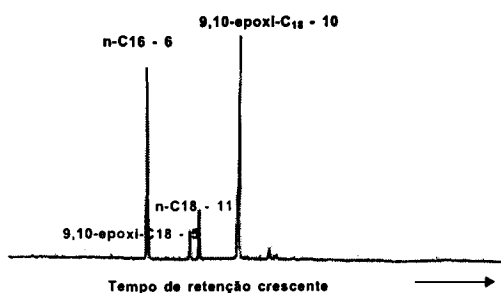


Figura 5. Cromatograma da corrente iônica total (CIT) da fração dos ésteres metílicos após epoxidação.

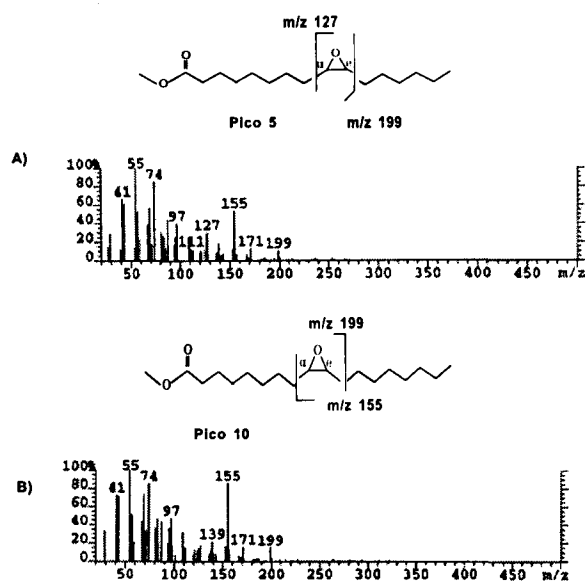


Figura 6. Espectros de massas: A) (Z)-9,10-epoxi-hexadecanoato de metila (pico 5) e B) (Z)-9,10-epoxi-octadecanoato de metila (pico 10) presentes no CIT da Figura 5.

dos Usineiros do Estado de Alagoas -NATT o apoio financeiro recebido durante a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Holloway, J. D.; Bradley, J. D. e Caster, D. J.; *Guides to Insects of Importance to man, I-Lepidoptera*, British Museu Natural History 1987, p. 180.
- Guagliumi, P.; *Pragas da cana-de-açúcar Nordeste do Brasil*, R. Janeiro, IAA 1973, 622p
- Mendonça, A. F.; *Pragas da cana-de-açúcar*, Maceió, Insetos & CIA.1996, 200P
- Arn, H.; Tóth, M. e Priesner, E.; *International Organization for Biological Control*, Montfavet 1992, 79 pp.
- Tamaki, Y.; *Sex Pheromone in Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, eds. Kerkut, G. A. e Gilberts, L. I.; Pergamon, New York. 1985. Cap. 9.
- Hunt, R. E. e Haynes, K. F.; *J. Insect. Physiol.* **1990**, *36*, 769.
- Klun, J. A.; Plimmer, J. R.; Bieerl-Leonhardt, B. A.; Sparks, A. N.; Primiano, M.; Chapman, O. L.; Lee, G. H. e Lepone, G.; *J. Chem. Ecol.* **1980**, *6*, 165.
- Rosell, G.; Hospital, S.; Camps, F. e Guerreo, A.; *Insect Biochem. Molec. Biol.* **1992**, *22*, 679.
- Roelofs, W. L. e Bjostad, L. B.; *Bioorganic Chemistry* **1984**, *12*, 279.
- Morrison, W. R. e Smith, L. M.; *J. Lipid Research* **1964**, *5*, 600.
- Adam, W.; Yuk-Yee, C.; Cremer, D.; Gauss, J.; Scheutzow, D. e Schindler, M.; *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2800.
- Morse, D.; Szittner, R.; Grant, G. G. e Meighen, E. A.; *J. Insect. Physiol.* **1982**, *28*, 863.
- McLafferty, F. W. e Turekek, F.; *Interpretation of Mass Spectra* 1993, 4a ed. 371 pp.
- Fukushima, Y.; Fuwakara, Y.; Yamado, A.; Suzuki, T.; *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 809.
- Fabrias, G.; Arsequell, G. e Camps, F.; *Insect Biochem.* **1989**, *2*, 177.