

Eletroantenografia - a antena do inseto como um biossensor



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 270

Eletroantenografia - a antena do inseto como um biossensor

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2008

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3448-4600 Fax: (61) 3340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Miguel Borges*

Secretária-Executiva: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Diva Maria de Alencar Dusi*
Luiz Adriano Maia Cordeiro
José Roberto de Alencar Moreira
Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Samuel Rezende Paiva

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*
Margot Alves Nunes Dode

Supervisor editorial: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Rosamaries Rocha Galvão*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Tratamento da Ilustração: *Daniele Alves Loiola*

Crédito foto da Capa: *Miguel Borges*

1ª edição

1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

E 39 Eletroantenografia: a antena do inseto como um biossensor / organização de

Maria Carolina Blassioli Moraes ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

22 p.: il. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia ISSN 0102 0110; 270).

1. Biossensor. 2. Eletroantenografia. 3. Percevejo. I. Moraes, Maria Carolina Blassioli, org. II. Série.

595.752 – CDD 21

Autores

Maria Carolina Blassioli Moraes

Química, Dr., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/NTCB
e.mail: mcbmoraes@cenargen.embrapa.br

Raul Alberto Laumann

Biólogo, Dr. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/NTCB
e.mail: laumann@cenargen.embrapa.br

Débora Pires Paula Biólogo, Dr. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/NTCB

Martin Pareja

Biólogo, Dr. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/NTCB

Cleonor Cavalcante A. Silva

Agrônoma, Ms. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/NTCB

Hugo G. Vieira⁴

Estudante de Biologia, Bolsista PIBIC/Embrapa

João de Mendonça Naime

Engenheiro Eletrônico, Dr., Embrapa Instrumentação Agropecuária

Miguel Borges

Biólogo, Dr. Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia/NTCB
e.mail: mborges@cenargen.embrapa.br

SUMÁRIO

Introdução	6
A antena é o nariz do inseto: morfologia e transmissão do estímulo.....	8
A antena como um detector analítico	13
Materiais e Métodos	14
Montagem do EAG ao cromatógrafo gasoso	17
Referências	21

Eletroantenografia - a antena do inseto como um biossensor

Maria Carolina Blassioli Moraes

Raul Alberto Laumann

Débora Pires Paula

Martin Pareja

Cleonor Cavalcante A. Silva

Hugo G. Vieira

João de Mendonça Naime

Miguel Borges

Introdução

Apesar de toda tecnologia desenvolvida nas últimas décadas na moderna agricultura, algo em torno de 37% do total da produção é perdida a cada ano devido a insetos (13%), patógenos (12%) e as plantas invasoras (12%). O mercado de defensivos agrícolas no país é de cerca de US\$ 2,3 bilhões, sendo que 26,9% de inseticidas, 3,7% de acaricidas, 17,9% de fungicidas e 51,4% de herbicidas (<http://www.sindag.com.br/>). No entanto, o crescente aumento do uso de agroquímicos na agricultura não é sustentável a longo prazo, especialmente porque esses produtos poluem o ambiente e os alimentos, compromete a vida silvestre e coloca em risco a saúde do próprio homem.

A demanda social pela preservação do meio ambiente e por alimentos livres de agrotóxicos têm imposto à ciência um novo paradigma de exploração dos recursos naturais à disposição da agricultura. Neste sentido, a Ecologia Química apresenta alternativas para o desenvolvimento de novas tecnologias auto-sustentáveis.

As informações disponíveis mostram que os produtos de origem biológica, por agirem somente sobre as pragas-alvo, favorecem o controle biológico natural contribuindo para a sustentabilidade do agroecossistema.

A descoberta das substâncias que intermedeiam as relações entre organismos da mesma espécie, denominadas feromônios, e entre espécies, denominada, aleloquímicos permitem o desenvolvimento de novos produtos para uso no manejo integrado de pragas. Os feromônios agem na comunicação intraespecífica e são classificados, segundo sua função, como feromônios de alarme, sexual, atração, agregação, entre outros. Os aleloquímicos agem na comunicação interespecífica e pode ser dividido em três classes: cairomônios, um composto ou uma mistura de compostos que beneficia o receptor do

sinal, alomônio beneficia o emissor do sinal e sinomônio que é um sinal que beneficia tanto o emissor como o receptor. Os aleloquímicos podem ter origem tanto de plantas como de insetos, alimentos ou outras fontes (DICKE e SABELIS, 1988).

A importância de feromônios em programas de manejo de pragas durante as últimas quatro décadas tem sido documentada por vários autores (ALDRICH e YONKE, 1975; BORGES e ALDRICH, 1992; FARINE et al. 1992; BLATT et al. 1998; LUSBY e KOCHANSKY, 1986; BORGES et al, 1998a, 1998b). Estes compostos têm várias vantagens quando comparados aos pesticidas químicos: (1) são específicos, (2) não afetam populações de pragas secundárias ou inimigos naturais, e (3) tem baixa toxicidade a mamíferos (SILVERSTEIN, 1981). O uso de feromônios como um método direto de controle de pragas ou para o monitoramento de populações pode contribuir para prevenir o uso indiscriminado de inseticidas (KYDONIEUS e BEROZA, 1982; ROELOFS, 1980).

Há dois pontos cruciais na pesquisa com semioquímicos um deles é a pequena quantidade produzida, principalmente pelos insetos, que requer equipamentos bastante sensíveis, e o segundo é comprovar a atividade biológica de um semioquímico através de bioensaios que, no geral, requerem longos períodos de experimentação até o estabelecimento da bioatividade deste(S) composto(S) químico(S).

Algumas destas limitações têm sido minimizadas com o avanço das técnicas analíticas. Hoje em dia, é possível identificar feromônios sexuais e outros semioquímicos usando um único indivíduo. Através de técnicas como extração de semioquímicos na fase sólida ou na fase vapor e uso de injetores de cromatografia com sistema de dessorção térmica, é possível aumentar a sensibilidade e eliminar etapas de eluição e uso de solventes.

Contudo, a realização de bioensaios ainda é uma etapa laboriosa, consumindo uma percentagem de tempo elevada no processo de identificação de semioquímicos, já que é necessário realizar uma série de bioensaios com uma variedade de compostos e mistura de compostos em diferentes concentrações. A eletroantenografia é uma técnica que utiliza a antena do inseto como um biossensor na identificação de moléculas eletroativas para o inseto, diminuendo assim o número de moléculas candidatas a serem bioativas. A antena ou mesmo a cabeça do inseto pode ser fixada entre dois eletrodos e quando a antena recebe um “puff” de estímulo químico ao qual tenha sensibilidade há uma variação no potencial elétrico que é registrado.

A eletroantenografia pode analisar compostos puros de forma individual e extratos brutos com multicomponentes presentes, neste último caso a eletroantenografia é acoplada a cromatografia gasosa, mas para identificar qual o papel deste composto, bioensaios em laboratório e em campo devem ser conduzidos.

Este artigo pretende mostrar, através das experiências da equipe da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, como a eletroantenografia pode ser usada para auxiliar na pesquisa com semioquímicos e as facilidades para montar um sistema de EAG ou GC-EAG.

A antena é o nariz do inseto: morfologia e transmissão do estímulo

A antena do inseto e outros artrópodes é um órgão especializado na captação e transmissão de estímulos olfativos e mecânicos. Elas podem discriminar a mínima mudança no sinal químico, seja na concentração do composto, na composição e na sua isomeria, o que confere a antena uma excelente especificidade e sensibilidade.

Para entender como a antena percebe os semioquímicos é necessário observar sua morfologia. Toda antena de inseto tem a mesma estrutura básica. A antena é dividida em uma série de segmentos cujo número pode variar entre espécies. Nos percevejos há três segmentos principais, o primeiro é chamado de *escapo*, o segundo segmento é o pedicelo, e o conjunto dos outros segmentos é chamado de flagelo (Figura 1). Em geral nas antenas de insetos adultos, no *escapo* e no pedicelo está localizado a maior parte dos sensores mecânicos (CHAPMAN, 1998) e no flagelo estão os receptores químicos, térmicos, principalmente nos segmentos mais distais da cabeça (por exemplo, F1 e F2, Figura. 1) (ZACHARUK, 1985). Esses receptores ficam nos pêlos, chamados de sensilas, que observamos em um microscópio. Existem diferentes tipos de sensilas que podem ser divididas em três grandes categorias: sensilas com poros distribuídos por toda a cutícula (multiporosas); sensilas com um poro na ponta (uniporosas); e sensilas sem poros. As mais importantes em recepção de feromônios e outras substâncias odorantes são as sensilas multiporosas, enquanto às uniporosas são principalmente gustativas e as sem poros são importantes como mecanosensitivas e termosensitivas. No entanto, há exceções e é possível encontrar sensilas uniporosas e sem poros com função olfativa.

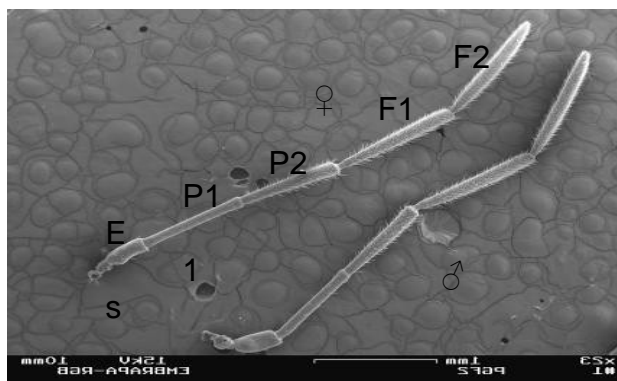


Figura 1. Eletromicrografia de varredura (SEM) da antena do macho e da fêmea de *E. heros* mostrando os três segmentos e suas subunidades. F=Flagelo (F1e F2 = primeiro e segundo segmento do flagelo; P1 e P2 = primeiro segundo segmento do pedicelo; E = escapo. Barra = 1 mm.

Existem diferentes tipos de sensilas, tricóides, basicônicas e estas apresentam subtipos, Nos machos da mariposa *Antharea polyphemus* foram identificados 60.000 sensilas tricóide, responsável pela detecção do feromônio sexual, e 10000 sensilas basicônicas, responsáveis pela detecção de outros odors, já nas fêmeas dessa espécie não foram encontradas sensilas tricóide, mas foram identificadas 12.000 sensilas basicônicas. As fêmeas das mariposas são as responsáveis pela liberação do feromônio sexual, o macho usa esse feromônio para localizar a fêmea para acasalamento, por isso

somente os machos tem sensilas tricóides, já as fêmeas precisam ter um eficiente sistema pra localizar odores de plantas, para colocar os ovos, o que explica o maior número de sensilas basicônicas. Mas nem todos os insetos seguem esta lógica. Nos percevejos não foram identificados diferenças qualitativas das sensilas, somente quantitativas (Cavalcante, dados não publicados) Foram identificadas diferentes tipos de sensilas na antena de fêmeas de *E. heros*. As sensilas basicônicas (Sb) apresentam cutícula simples, com ranhuras longitudinais e um grande número de poros e são facilmente distinguíveis uma das outras quanto ao formato e inserção da base (Fig. 2 A, B, C, D). As sensilas tricódeas¹ (St1) são pêlos finos, longos, com comprimento variável. A parede é lisa, sem poros e a base se encaixa numa saliência da cutícula, já as sensilas tricódeas 2 (St2). são mais longas e articuladas na base, a cutícula pode ser lisa ou com ranhuras longitudinais e uma leve depressão no ápice, indicando a abertura de um poro.

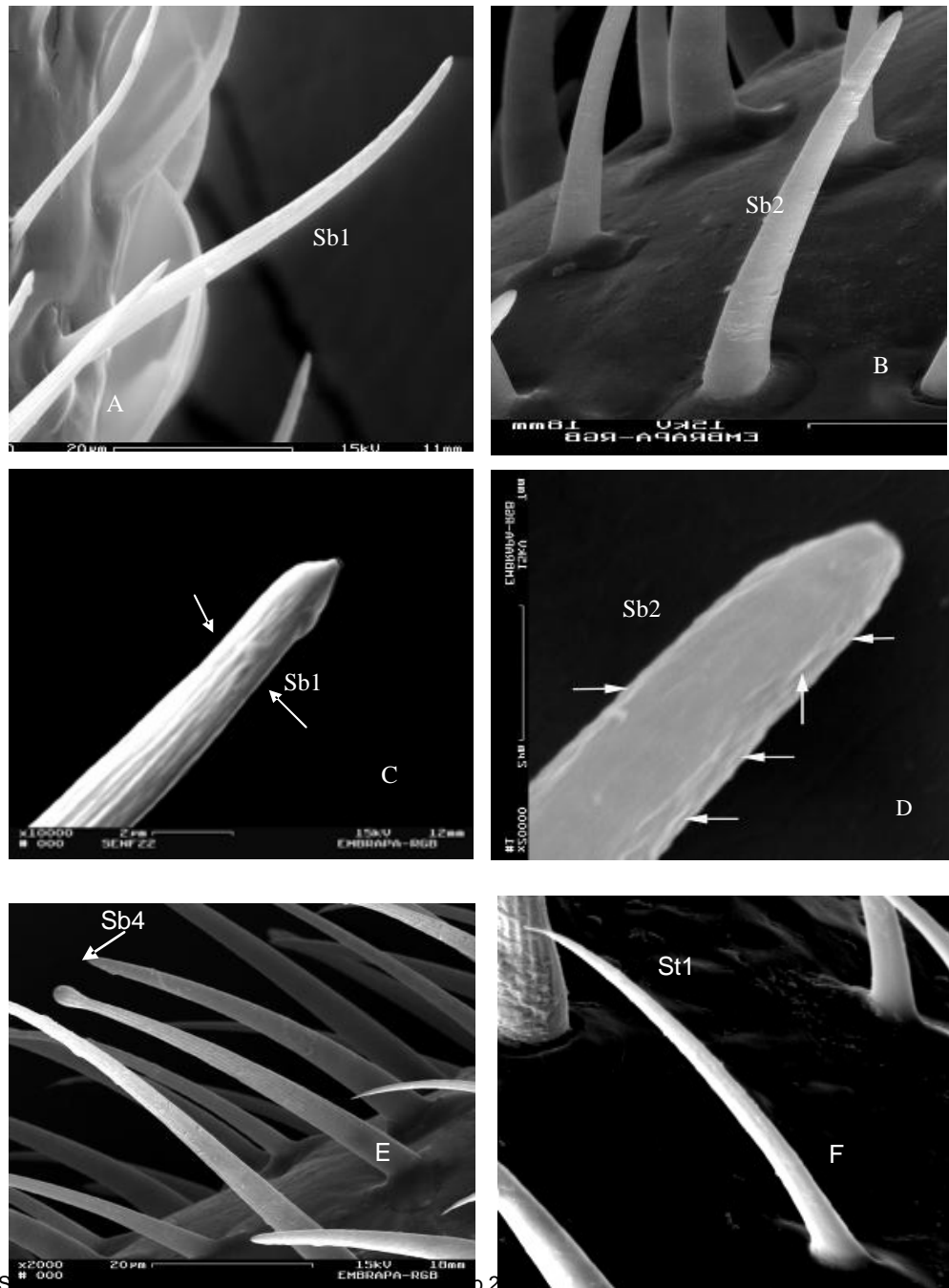


Foto: Cleonor C. A. Silva

Figura 2. 2A e B — Sensila basicônica Sb1 e Sb2. C — sensila basicônica SB1 mostrando a presença de estrias e poro na sua extremidade. Bar = 2 µm. D — sensila BS2 as setas indicam a presença de poros por sua extensão. E — sensila Sb4 encontrada no pedicelo. F. Sensila tricoide St1 localizada no flagelo 1.

A estrutura interna da sensila consiste, principalmente, da estrutura dos receptores neuronais de olfação (ORN, sigla do inglês *olfactory receptor neurons*) que a compõem. Os ORN têm uma seção central chamada *soma* ou *dendrito interno*, desta seção saem duas extensões: uma chamada *dendrito externo*, que atravessa a sensila inteira e está mergulhada em um meio aquoso, chamado de linfa sensilar, onde ocorre a recepção da molécula de odor e a outra chamada axônio responsável condução do estímulo até os lobos antenais do deutocérebro que processam a informação (STENGL et al., 1999) (Fig 3).

Até pouco tempo atrás não se sabia muito bem como moléculas de odores estimulavam as células nervosas dentro das sensilas. O principal desafio era descobrir como moléculas odoríferas, no geral hidrofóbicas (pouco solúveis em água), eram solubilizadas e transportadas na linfa sensilar de natureza aquosa (VOGT et al., 1999). Na década de 80 foram identificadas proteínas hidrossolúveis, sendo chamadas de proteínas ligantes de odores (PLO) (ou OBP, *odorant binding proteins*, pela expressão em inglês) que poderiam agir como um meio de transporte para estas moléculas. Posteriormente, foi constatado que as moléculas de odores entram na linfa sensilar através de poros tubulares localizados na cutícula, e uma vez na linfa sensilar, são recepcionadas por e pelas PLO e são transportadas até moléculas receptoras específicas presentes na superfície externa da membrana do dendrito (STENGL et al., 1999). O complexo PLO-odorante então interage com o receptor neuronal e desencadeia uma cascata de reações bioquímicas secundárias que culminam com a geração de um sinal elétrico transmitido através do corpo dendrítico (Fig. 3). A interação do complexo PLO-odorante com o receptor neuronal faz com que a PLO perca sua afinidade à molécula odorante e a libere para a degradação enzimática no interior da linfa sensilar.

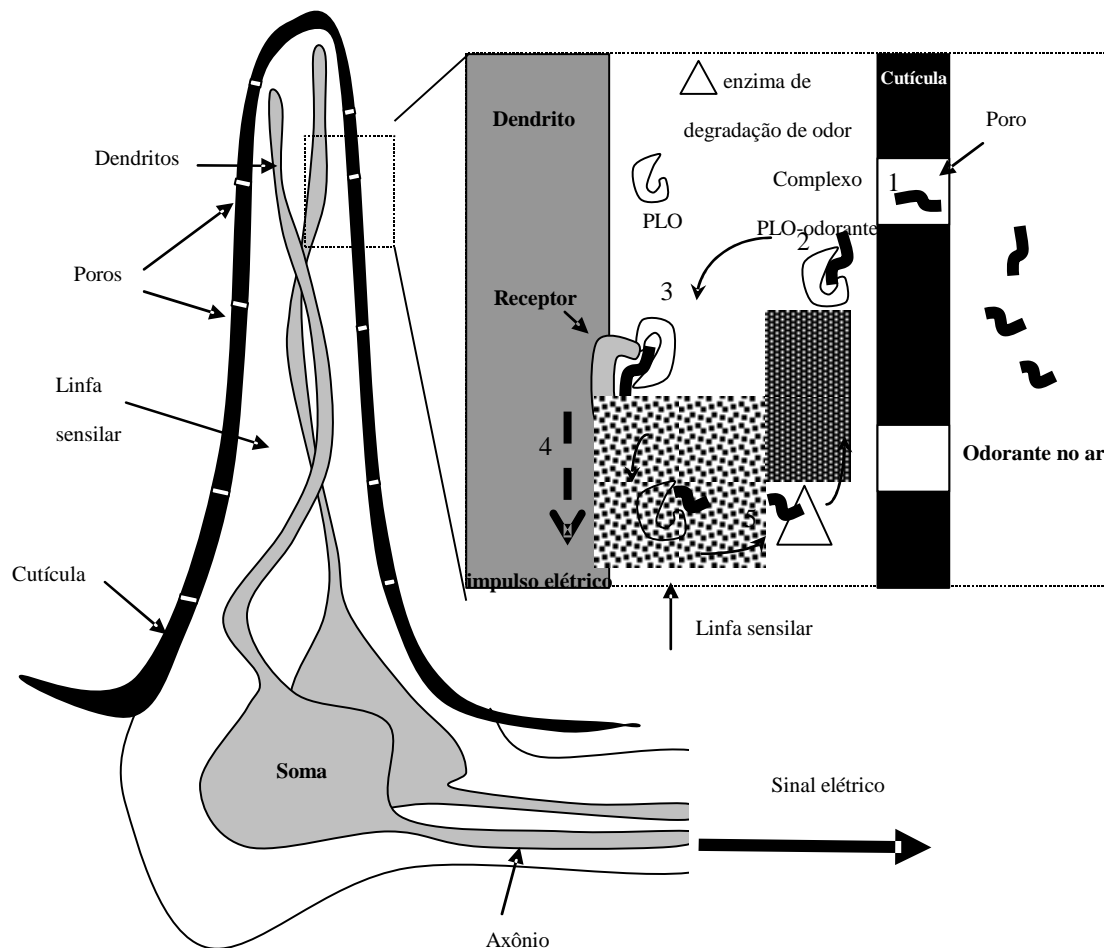


Foto: Miguel Borges

Figura 3. Diagrama representando uma sensila e as estruturas internas da mesma. A caixa mostra os eventos perireceptivos, onde o odorante atravessa a cutícula através dos poros (1), na linfa sensilar estão as proteínas ligantes de odor ou feromônio (PLO), que complexam o odorante (2) para conduzi-lo até a membrana do dendrito (3). O odorante se liga com o receptor na membrana celular do dendrito, causando o desencadeamento de sinais elétricos (4). O dendrito, o soma e o axônio formam o neurônio receptor de odorante (*Odorant Receptor Neuron* - ORN, pelas siglas em inglês). Após a estimulação neuronal, o odorante é degradado por enzimas específicas (5) até tornarem-se metabólitos inativos. Adaptação de Leal (2005).

O mecanismo de estimulação olfativa neuronal em insetos, que culmina com a geração de sinal elétrico, ocorre de maneira similar ao de vertebrados. Na ausência de odores, há maior concentração de cálcio, sódio e cloro do lado exterior da membrana e maior concentração de potássio e ânions orgânicos no seu interior. No repouso há, portanto uma diferença de potencial eletroquímico (exterior com predominância de carga positiva e interior com predominância de carga negativa) e a membrana dendrítica está polarizada. Ao haver a interação do complexo PLO-odorante com o receptor neuronal dendrítico, há a ativação da proteína G acoplada, e por sua vez a ativação da fosfolipase C (PLC) transmembrânica que gera inositol-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol. O aumento de IP_3 intracelular causa o influxo de cálcio através de canais protéicos cálcio-dependentes. Com o aumento de cálcio ocorre a estimulação da abertura de canais iônicos pela proteína C quinase (PKC) transmembrânica, aumentando ainda mais o influxo de cátions (Fig. 4). Estes eventos provocam a despolarização da membrana (chamado de potencial de ação) que se propaga, em forma de uma corrente eletroquímica, até o axônio. Em milissegundos, a membrana é repolarizada graças ao fechamento dos canais iônicos e à ativação de bombas eletrogênicas, que por transporte ativo, restabelecem a diferença de potencial eletroquímico no dendrito em repouso (STENGL et al., 1999). Estes sinais de cargas elétricas originado pelo fluxo de cátions através da membrana do axônio é o sinal medido pela eletroantenografia.

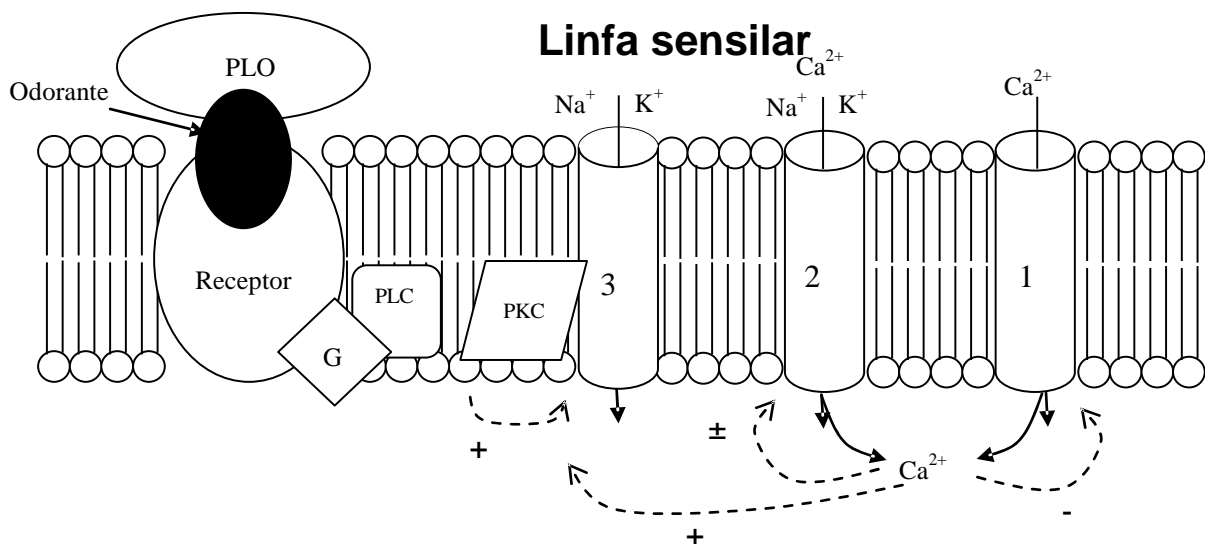


Figura 4. Representação simplificada da membrana dos neurônios que transmitem o sinal elétrico da sensila aos centros de processamento neuronal do inseto. A membrana em repouso permanece polarizada graças à diferença eletroquímica entre a membrana (negativo dentro da célula e positivo fora). A ligação do complexo de proteína ligadora de odorante (PLO) com o receptor localizado na membrana do dendrito desencadeia uma cascata de reações bioquímicas secundárias que culminam com a geração de um sinal elétrico. Proteínas de membrana (G, PLC e PKC, vide texto) que participam da cascata de reações ativam a abertura dos canais iônicos, causando entrada cálcio (Ca^{2+}) (fluxo 1). A elevada concentração intracelular de íons Ca^{2+} ativa o fluxo de correntes de íons não-específicos (fluxo 2) e um fluxo dependente do cálcio que depende da proteína C quinase (fluxo 3). Os íons cálcio têm um papel importante na regulação deste processo, ativando e desativando canais (indicado por + e - no diagrama) (Figura adaptada de STENGL et al., 1999).

A antena como um detector analítico

O primeiro estudo eletrofisiológico foi realizado por Schneider (1957) para medir a resposta da antena da mariposa da seda, *Bombyx mori*, a voláteis do feromônio sexual da fêmea. A antena de um macho foi cortada e fixada entre dois eletrodos. A ponta da antena foi colocada no eletrodo de trabalho e a base no eletrodo de referência, que estava aterrado. Uma solução salina foi usada para fechar o circuito e os eletrodos conectados a um osciloscópio. Quando a antena do macho recebeu um “puff” do feromônio sexual, houve a despolarização da antena e uma deflexão negativa da voltagem foi medida no osciloscópio, 1-2 mV, seguido por um lento retorno a linha base (repolarização da antena), aproximadamente 1 a 2 segundos. Com esta montagem foi possível medir a atividade de substâncias puras para as antenas dos insetos, somente doze anos depois Moorhouse et al. (1969) realizaram o primeiro estudo com o eletroantenograma acoplado ao cromatógrafo gasoso. O acoplamento do detector de EAG, que tem alta especificidade e sensibilidade, ao cromatógrafo gasoso, que apresenta alta resolução na separação de misturas, permitiu a análise de misturas complexas obtidas diretamente do inseto ou da planta sem prévios tratamentos. O efluente da coluna do cromatógrafo é dividido e enviado simultaneamente ao detector de ionização de chama (DIC) e ao EAG.

A técnica de EAG vem sendo aplicada a insetos de diferentes ordens: Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Orthoptera e Trichoptera (MOREIRA et al., 2006; LEAL et al., 2008; RUIZ-MONTIEL et al., 2008; WILLIAMS et al., 2008; INOCENZI et al., 2008; NJAGI et al., 2008), e outros tipos de animais como caranguejos (STENSMYR et al., 2005). A técnica de EAG é bastante útil para detectar se uma amostra tem componentes com atividade sobre um inseto e através de frações da amostra é possível isolar os componentes com atividade. Amostras, frações e soluções de padrões puros podem ser testadas por EAG em poucas horas de trabalho. Obter o mesmo resultado por bioensaios poderia levar semanas, até meses. Quando há disponibilidade de GC-EAG, a potencialidade do equipamento é muito maior, uma vez que é possível a partir de uma mistura complexa, em menos de uma hora, fracionar e identificar possíveis compostos ativos ao inseto.

Como descrito anteriormente os eletrodos medem a diferença de tensão gerada pelo movimento de íons através da membrana neuronal (descrito acima). Cada célula receptora de odores na antena funciona como um conjunto de resistência e uma fonte de tensão. Quando a antena é colocada entre os dois eletrodos e recebe o “puff” com a substância química, ocorre uma despolarização e a tensão medida entre os dois eletrodos é alterada. O sinal lido é amplificado e enviado através de uma placa conversora analógico/digital para o computador. O sinal registrado pode ser dividido em quatro fases (Figura 5): (I) uma rápida despolarização; (II) repolarização da antena; *(III) hiperpolarização, seguido de (IV) um lento retorno à linha base. Esta resposta no geral depende da dose do composto aplicada (Fig. 5A), concentrações maiores resultam em despolarizações mais pronunciadas (Fig. 5B).

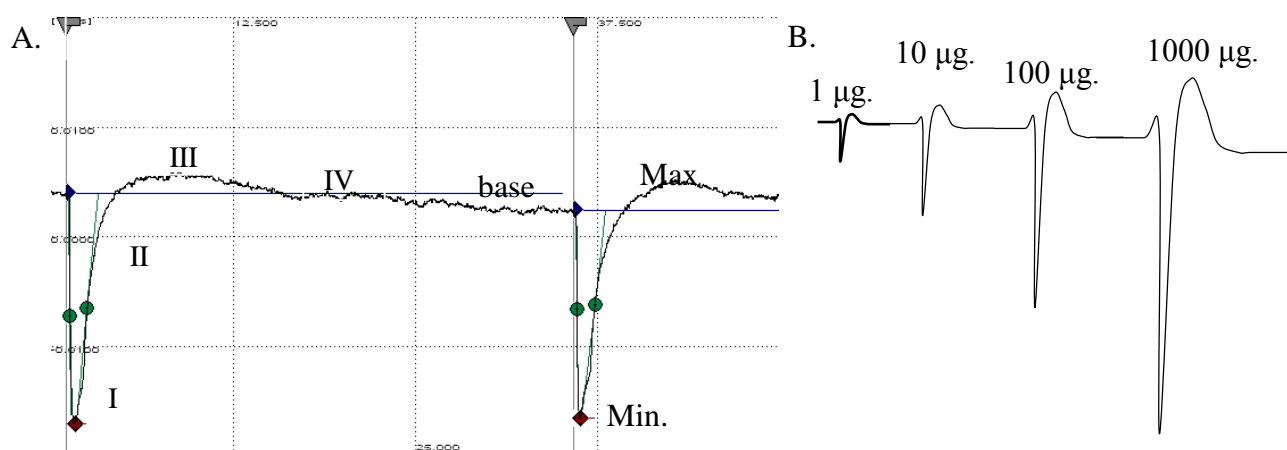


Figura 5. A. Típica resposta do EAG a pulsos de resposta eletrofisiológica: (I) rápida despolarização, (II) retorno a linha base (repolarização), (III) hiperpolarização, (IV) lento retorno à linha base. A linha em verde fornece a inflexão máxima medida neste sinal, que é calculada em mV. B. Exemplo de resposta dependente da dose aplicada.

Materiais e Métodos

A Syntech (Syntech – Holanda) é a única fabricante comercial de eletroantenogramas no mundo. No Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos da Embrapa-CENARGEN está instalado o sistema IDAC-2 com um controlador de fluxo.

O *software* da Syntech permite exportar os dados obtidos para planilhas de cálculos comuns como Excel ou Origin para posterior análise. Esse sinal, em geral, é normalizado com um sinal de um composto de referência. O composto de referência pode ser tanto de uma substância ativa ou não para o inseto.

O crisomelídeo *Diabrotica speciosa* é uma importante praga de várias curcubitáceas e ensaios em laboratórios mostraram sua atração a extratos aquosos e orgânicos obtidos de macerados da curcubitácea *Lagenaria vulgaris*. Resultados semelhantes foram obtidos em bioensaios em olfatometro de quatro escolhas com extratos orgânicos da *L. vulgaris*, indicando que compostos voláteis desta planta mudam o comportamento da *Diabrotica speciosa* (SANTOS et al., 2004). O perfil cromatográfico do extrato orgânico da *Lagenaria vulgaris* apresentou mais de 30 compostos. Para identificar quais destes compostos poderiam afetar o comportamento de *D. speciosa*, bioensaios de eletroantenografia foram realizadas usando padrões sintéticos (Sigma Aldrich, Co.) de compostos identificados nos extratos orgânicos de *L. vulgaris* como: 1-octanol, (*E*)-2-hexenal, decanal, nonanol, nonanal, e 6-metil-5-heten-2-ona. Todos os padrões foram preparados na concentração de 10 mg/ml em hexano. Cada composto foi testado de forma discreta usando o equipamento da Syntech.

Para os bioensaios foram utilizadas antenas de fêmeas, as quais foram cuidadosamente cortadas na base usando pinça e tesoura entomológica. A extremidade da antena foi colocada no eletrodo de

trabalho e a base no eletrodo de referência. O eletrodo com a antena foi conectado ao pré-amplificador e um gel condutor foi colocado em quantidade suficiente para cobrir as extremidades da antena nos eletrodos. Um fluxo de ar umidificado é mantido continuamente sobre a antena para evitar desidratação (Fig. 6).

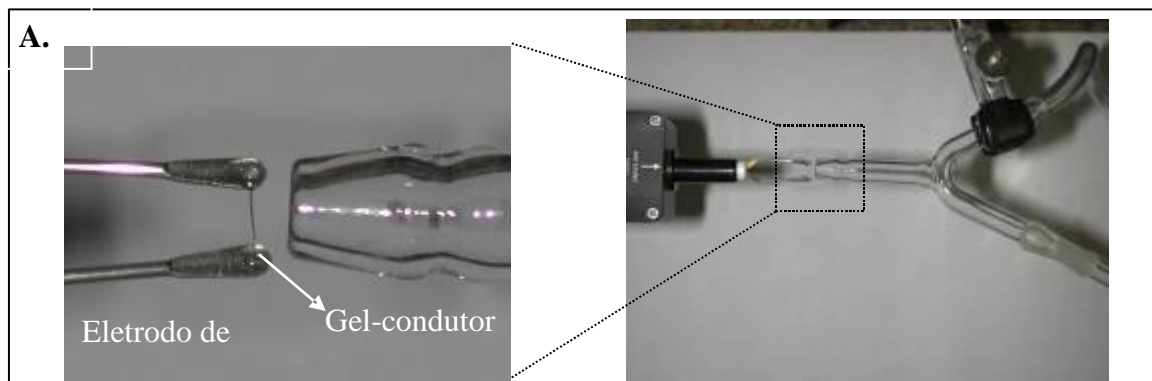


Foto: Miguel Borges

Figura 6. A. Montagem da antena no eletrodo de prata no sistema de EAG da Synthec. B. Eletrodo conectado a caixa do pré-amplificador e Y em vidro de borossilicato por onde passa o fluxo de ar umidificado e o composto a ser testado.

Pulsos de 1 segundo, com o composto químico a ser avaliado, foram emitidos a intervalos de 30 segundos. Após a emissão de três a quatro pulsos por composto, foram emitidos pulsos de n-hexano com a mesma duração e intervalo que os anteriormente citados. Os resultados de EAG foram obtidos usando 5 antenas de diferentes indivíduos de *D. speciosa* para cada composto e para cada indivíduo foram realizadas 16 medidas com o composto e 32 com o hexano, assim sendo, foram realizados 80 medidas com as antenas de fêmeas com cada composto testado (Fig. 7). Os valores médios da resposta da antena do inseto frente ao hexano (medidos em V) foram usados como valores de referência e comparados com os valores médios da resposta frente aos diferentes compostos avaliados através de teste t. Em geral, a experimentação com cada composto foi de 4 horas de trabalho, o que ratifica o exposto anteriormente sobre as vantagens da técnica de eletroantenografia para avaliação de semioquímicos. Em média as antenas de fêmeas de *Diabrotica speciosa* têm um curto tempo de vida útil em torno de 20 a 30 minutos. Com estes experimentos foi possível identificar que dois destes compostos, o decanal e o 6-metil-5-hepten-2-one, podem ter alguma função na comunicação química destes insetos e deverão ser testados em bioensaios em olfatômetros ou arena (Fig. 7).

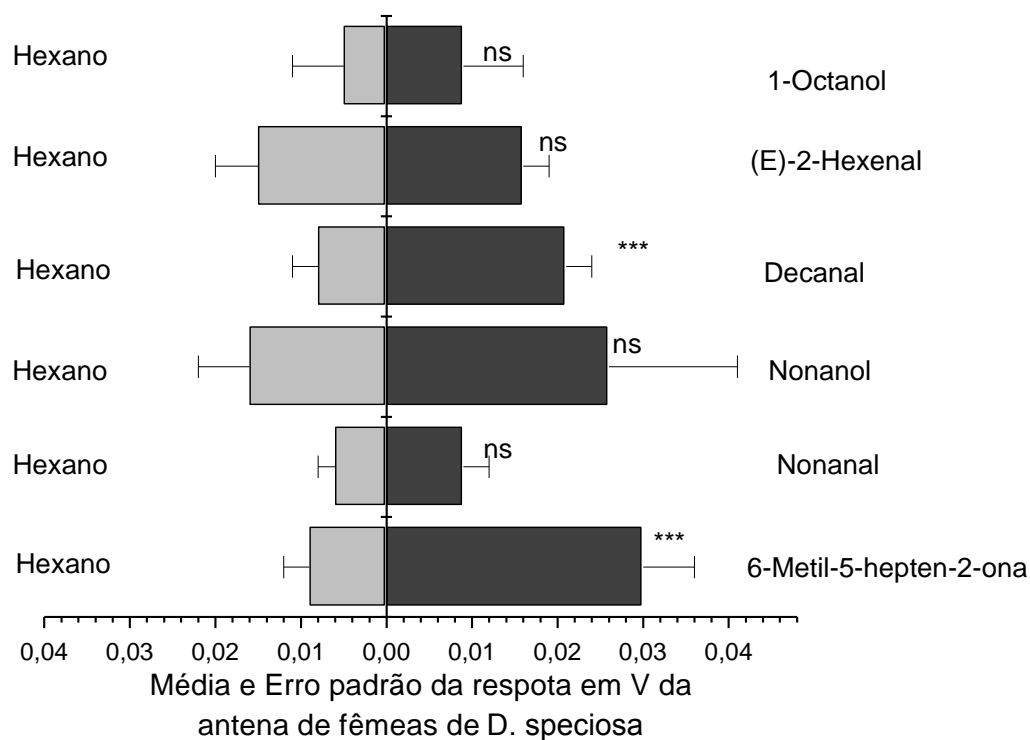


Figura 7. Valores médios da resposta da antena de *D. speciosa* medida em V e erro- padrão para uma série de compostos de voláteis identificados na planta *Lagenaria vulgaris*. Os símbolos “ns” representam diferenças não-significativas e “***” representam diferenças significativas, significativas entre os valores medidos quando a antena foi estimulada com os compostos ou com solvente (n-hexano), de acordo com o teste estatístico *t* de Student ($P < 0,001$).

Sistemas comerciais como o da Synthec não permitem ter controle sobre os parâmetros de medida, bem como sobre a forma de apresentação dos resultados, além de apresentar um elevado custo para sua aquisição. Sendo assim, a equipe do Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos de Insetos da Embrapa CENARGEN juntamente com pesquisadores da Embrapa Instrumentação Agropecuária (CNPTIA) trabalharam no desenvolvimento de um eletroantenograma. O sistema elaborado é representado no fluxograma abaixo (NAIME et al., 2006) (Fig. 8).

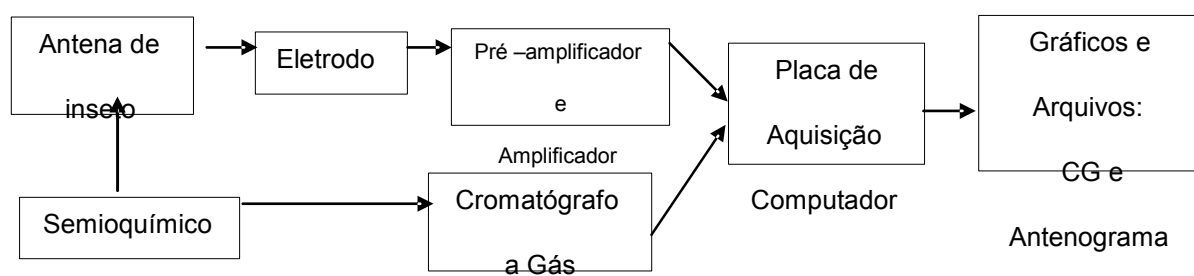


Figura 8. Diagrama em blocos do eletroantenograma, construído pela equipe da Embrapa.

No sistema desenvolvido por Naime et al. (2006) o eletrodo de referência é móvel (Fig. 9A), permitindo ajustar a distância entre os dois eletrodos, sendo possível usar antenas menores, da ordem de $1 \mu\text{m}$. O eletrodo de referência é aterrado e o eletrodo de trabalho é conectado na entrada de um pré-amplificador de instrumentação com resistência de entrada (10^{12}), assim é preservada a baixa potência gerada pela antena que tem resistência interna da ordem de 10^6 . A amplitude da tensão gerada pela antena aumenta com o incremento da concentração do estimulante, quando este apresenta

atividade sobre o sistema olfativo do inseto, até que seja atingido um nível de saturação. Essa amplitude é dependente principalmente da natureza do estímulo, da espécie do inseto, do sexo, entre outros fatores. A faixa de amplitude da tensão vai desde microvolts até algumas unidades de milivolts. Os eletrodos de fio de platina foram montados em um conector BNC, onde a distância entre eles pode ser regulada girando o parafuso conectado ao eletrodo de referência (aterrado) conectado à carcaça do BNC e à malha do cabo coaxial (Figura 9A). O outro eletrodo que permanece fixo está conectado ao condutor central do BNC e do cabo coaxial. A Fig. 9B mostra a foto do pré-amplificador montado em sua blindagem metálica. O conector da esquerda traz o sinal do eletrodo, o conector superior recebe as tensões de alimentação e o conector da direita conduz o sinal de saída para o amplificador.

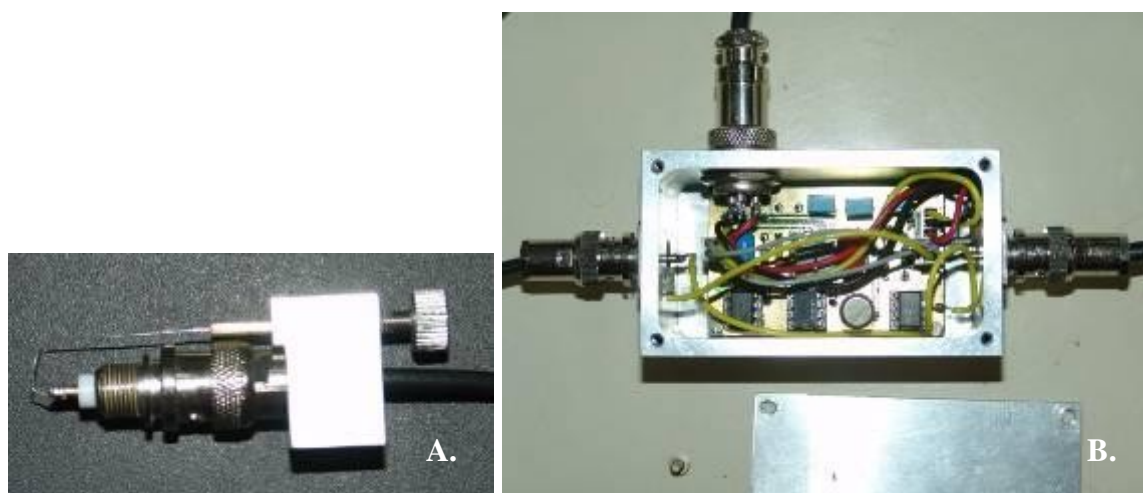
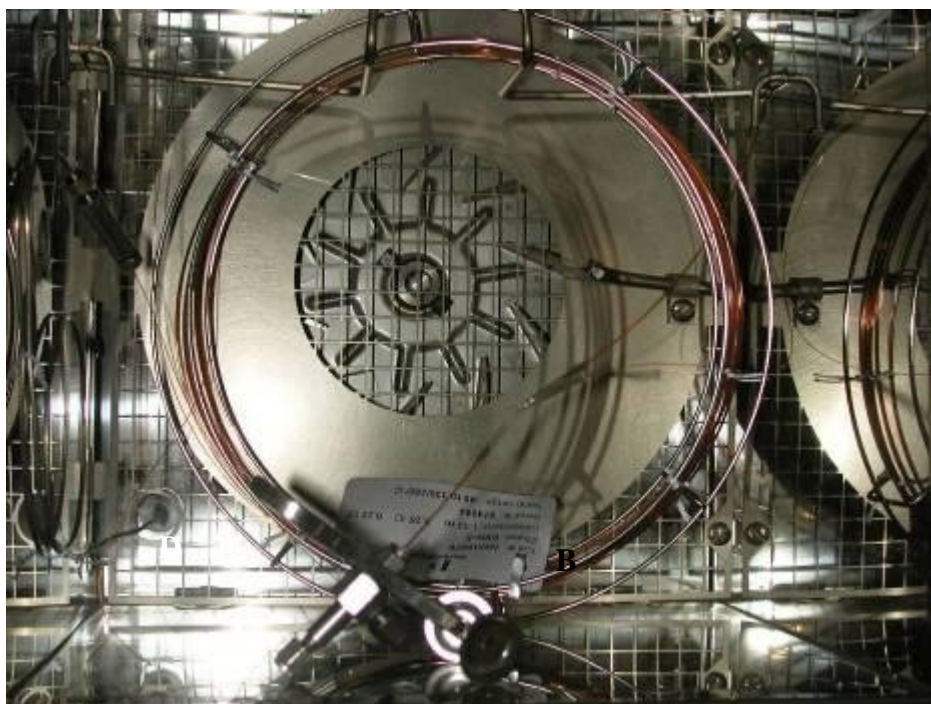


Foto: Miguel Borges

Figura 9. A. Eletrodos para conexão da antena. **B.** Pré-amplificador.

Montagem do EAG ao cromatógrafo gasoso

A Fig. 10 mostra a montagem para a divisão do fluxo no interior do forno do cromatógrafo gasoso para os detectores de EAG e ionização de chama (DIC). Para a montagem foi utilizado um cromatógrafo gasoso da Perkin Elmer composto por dois injetores e dois detectores de ionização de chama. Um dos detectores foi desativado e o sistema de aquecimento usado para a saída do efluente para o EAG. É importante manter o bloco de aquecimento para evitar a condensação do efluente saindo do forno do GC. A coluna usada nesta montagem é uma 100% metil polisiloxano (DB-1), com as seguintes dimensões 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro externo e espessura de filme de 0,25 μm . Antes da divisão do fluxo foi acoplada a coluna um “make-up” gás usando um “T” em aço inoxidável. Este gás é necessário para evitar re-fluxo e garantir que os dois fluxos alcancem simultaneamente os detectores. O fluxo foi dividido usando um Y em borossilicato, após a divisão a coluna que conduz o fluxo ao EAG tem o diâmetro ligeiramente maior (0,53 mm) do que a coluna usada para o DIC (0,25 mm), isto para permitir que a maior parte da amostra alcance o detector de EAG (a antena).



A

Fotos A – B - C: Miguel Borges



B



C

Figura 10. A. Conexões do make-up gás usando em T em aço inoxidável para combinar o fluxo do make-up gás com o fluxo da coluna; B. Conector em “T” ampliado. C. Entrada da coluna para o DIC e entrada da coluna para o EAG.

A coluna passa através de um tubo de cobre que a mantém aquecida até alcançar a camisa de refrigeração (Figura 11C). O eletrodo com a antena do inseto é colocado em um das extremidades da camisa mais próxima a saída da coluna. Na outra extremidade da camisa há a entrada de ar para manter a umidade na antena (Fig. 11 B). O ar é filtrado usando carvão ativado e a água que circula na camisa é resfriada com gelo. É importante que a antena fique bem próxima da saída da coluna, caso contrário pode haver perda por dispersão ou mesmo condensação do efluente e o fluxo da coluna não chega a antena. O resfriamento na camisa é necessário para minimizar o efeito de aquecimento do forno do GC sobre a antena, que pode ressecar e perder a sensibilidade ou mesmo parar de responder.

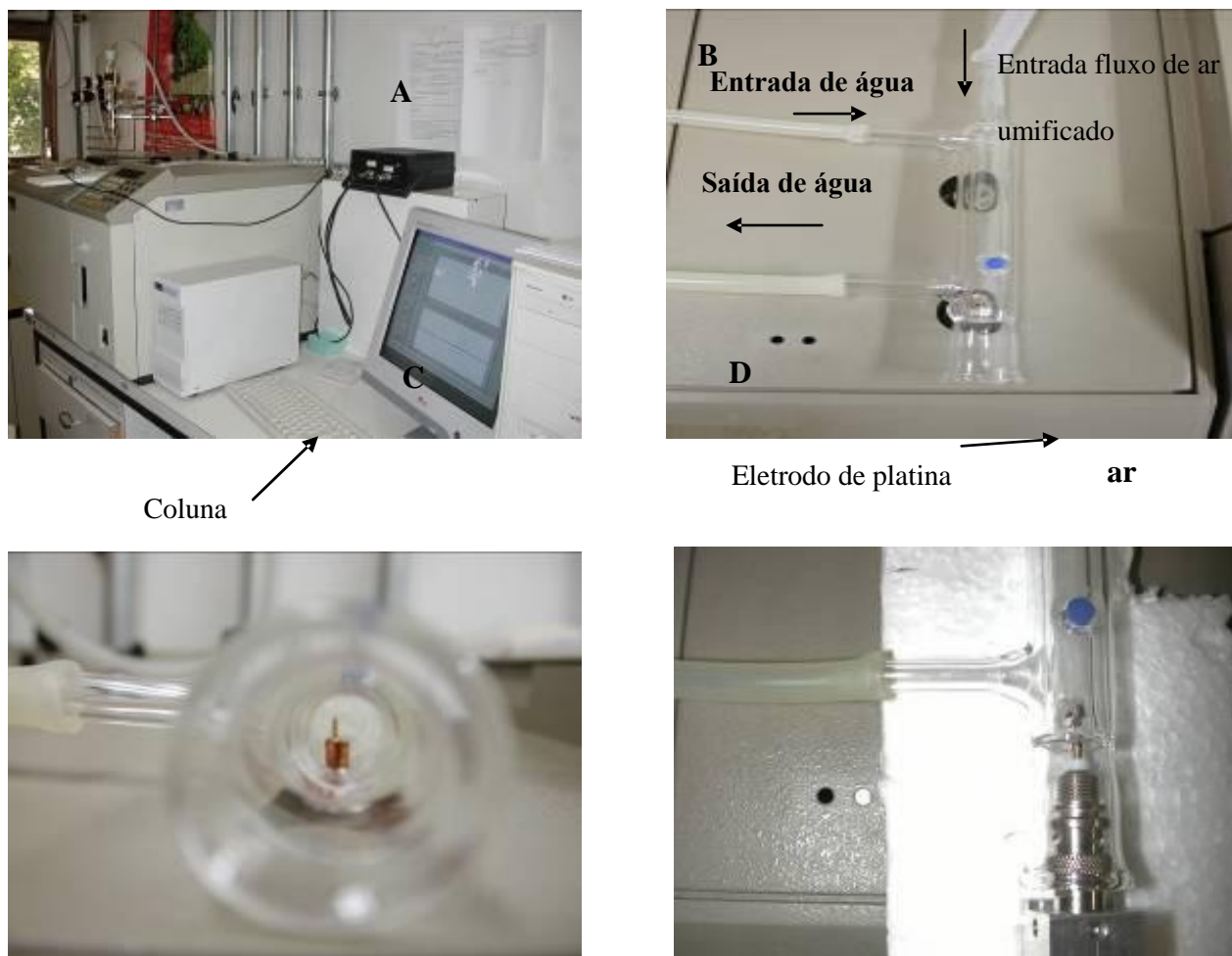


Foto: Miguel Borges

Figura 11. A. Cromatógrafo gasoso da Perkin Elmer-Autosystem XL usado para o acoplamento. B. Parte superior do cromatógrafo onde foi colocada a camisa de refrigeração. C. Saída da coluna capilar para a camisa de vidro. D. Eletrodo de platina montado próximo a saída da coluna.

A eletroantenografia é uma ferramenta muito útil para auxiliar o pesquisador a identificar semioquímicos eletrofisiologicamente ativos a um determinado inseto em uma mistura complexa de compostos. A Figura 12 representa um trabalho desenvolvido pelos pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que exemplifica a resposta da antena do parasitóide de ovos *Telenomus podisi* a mistura de voláteis obtidos da aeração de uma planta de soja variedade Conquista. O traçado superior na Fig. 12 mostra a resposta da antena do inseto aos compostos presentes na mistura de voláteis obtidos da soja (traçado inferior obtido no detector de ionização de chama). A resposta obtida do EAG é simultânea a resposta do DIC, desta forma é possível saber qual composto o inseto está respondendo.

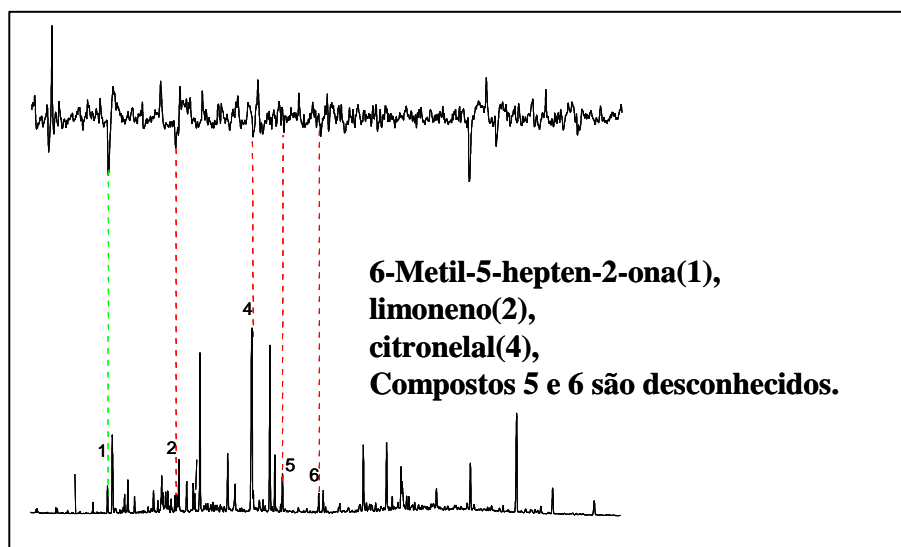


Figura 12. Resposta da antena do parasitóide de ovos *T. podisi* a voláteis da soja Conquista. Traçado superior resposta da antena do inseto. Traçado inferior resposta do detector de ionização de chama.

O cromatograma dos voláteis da soja apresenta uma série de compostos, dos quais em torno de 30 teriam potencial para ser testados no manejo de insetos. Através dos resultados do GC-EAG foi possível identificar que somente 5 destes compostos foram eletrofisiologicamente ativos a antena do parasitóide de ovos *T. podisi*. Três destes compostos foram identificados por espectrometria de massas como sendo a cetona 6-metil-5-hepten-2-ona, e os terpenos limoneno e citronelal. Os outros dois compostos não foram identificados. Desta forma, os bioensaios a serem conduzidos podem ser iniciados com estes compostos usando padrões sintéticos ou através das frações da amostra contendo estes compostos.

Para o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de insetos-praga eficientes e sustentáveis deve ser gerado conhecimento detalhado de vários aspectos da biologia, comportamento e química destes insetos e de seus inimigos naturais. Para isto são necessárias tecnologias de última geração para a pesquisa da fisiologia dos insetos. A técnica de eletroantenografia é uma metodologia que pela sua sensibilidade e confiabilidade tem resultado de grande utilidade para estudos de ecologia química sendo, em muitos casos, a principal ferramenta para a identificação de feromônios. Por exemplo, insetos como os microlepidópteros (LEAL et al., 2008, MOREIRA et al., 2006), que liberam quantidades diminutas dos componentes do feromônio sexual, estando muitas vezes abaixo do nível de detecção do cromatógrafo gasoso e do GC-MS, é necessária uma quantidade enorme de insetos, (1000 glândulas, por exemplo) para conseguir obter traços do composto no detector de DIC. A antena do inseto é bem mais sensível e pode dizer com confiabilidade se há compostos eletroativos presentes na amostra que muitas vezes o detector DIC não detecta. A técnica também é muito útil para identificar possíveis compostos bioativos em amostras complexas, como mostradas nos estudos conduzidos em

nosso laboratório para a identificação de compostos ativos da *Lagenaria vulgaris* para a *D. speciosa* (SANTOS et al., 2004) e do parasitóide de ovos *Telenomus podisi* a voláteis da soja (MORAES et al., 2005). Fêmeas de *D. speciosa* responderam para somente dois dos seis compostos testados. Assim bioensaios podem ser conduzidos em olfatomетria com estes dois compostos em diferentes concentrações, isolados e/ou combinados, podem posteriormente mostrar, através da análise do comportamento dos insetos se é possível sua utilização para o manejo destes insetos no campo.

Referências

- ALDRICH, J. R.; YONKE, T. R. Natural-products of abdominal and metathoracic scent glands of coreoid bugs. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 68, p. 955-960, 1975.
- BLATT, S. E.; BORDEN, J. H.; PIERCE, H. D.; GRIES, R.; GRIES, G. Alarm pheromonesystem of the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 24, p. 1013-031, 1998.
- BORGES, M.; ALDRICH, J. R. Instar-specific defensive secretions of stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae). **Experientia**, Basel, Suíça, v. 48, p. 893-896, 1992.
- BORGES, M.; MORI, K.; COSTA, M. L. M.; SUJII, E. R. Behavioural evidence of methyl-2,6,10-trimethyltridecanoate as a sex pheromone of *Euschistus heros* (Het., Pentatomidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 122, p. 335-338, 1998b.
- BORGES, M.; SCHMIDT, F. G. V.; SUJII, E. R.; MEDEIROS, M. A.; MORI, K.; ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA, J. T. B. Field responses of stink bugs to the natural and synthetic pheromone of the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). **Physiological Entomology**, Oxford, Inglaterra, v. 2, p. 202-207, 1998a.
- CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 4. ed. Cambridge: Harvard University Press, 1998.
- DICKE, M.; SABELIS, M. W. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? **Functional Ecology**, London, v. 2, p. 131-139, 1988.
- FARINE, J. P.; BONNARD, O.; BROSSUT, R.; QUERE, J. L. Chemistry of pheromonal and defensive secretions in the nymphs and the adults of *Dysdercus cingulatus* Fabr (Heteroptera, Pyrrhocoridae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 18, p. 65-76, 1992.
- INNOCENZI, P. J.; HALL, D. R.; CROSS, J. V.; MASUH, H.; PHYTHIAN, S. J.; CHITTAMARU, S.; GUARINO, S. Investigation of long-range female sex pheromone of the European tarnished plant bug, *Lygus rugulipennis*: chemical, electrophysiological, and field studies. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 30, p. 1509-1529, 2008.
- KARLSON, P.; LÜSCHER, M. Pheromones – a new term for a class of biologically active substances. **Nature**, London, v. 183, p. 155-157, 1959.
- KYDONIEUS, A.; BEROZA, M. Pheromones and their use. In: KYDONIEUS, A. F.; BEROZA, M.; ZWEIG, G. (Ed.). **Insect suppression with controlled release pheromone systems**. Boca Raton: CRC Press, 1982. v. 1, p. 3-12.
- LEAL, W. S. Pheromone reception. In: SCHULZ, S. (Ed). **The chemistry of pheromones and other semiochemicals II: topic in current chemistry**. Berlin: Springer, 2005. v. 1, p. 1-36.
- LEAL, W. S.; PARA-PEDRAZZOLI, A. L.; COSSÉ, A. A.; MURATA, Y.; BENTO, J. M. S.; VILELA, E. F.

Identification, synthesis, and field evaluation of the sex pheromone of the citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella*, **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 32, p. 155-168, 2008.

LUSBY, W. R.; KOCHANSKY, J. P. Identification of male-specific exocrine secretions from predatory stink bugs (Hemiptera, Pentatomidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 3, p. 1-12, 1986.

MOORHOUSE, J. E.; YEADON, R.; BEEVOR, P. S.; NESBITT, B. F. Method for use in studies of insect chemical communication. **Nature**, London, v. 223, p. 1174-1175, 1969.

MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; PIRES, C. S. S.; SUJII, E. R.; BORGES, M. Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 115, p. 227-237, 2005.

MOREIRA, J. A.; MCELFRISH, J. S.; MILLAR, J. G. Identification, synthesis, and field testing of the sex pheromone of the citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 32, p. 169-194, 2006.

NAIME, J. M.; MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; BORGES, M. Eletroantenograma para estudo comportamental de insetos. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2006. 5 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Comunicada Técnico, 74).

NJAGI, P. G. N.; TORTO, B.; OBENGOFORI, D.; HASSANALI, A. Phase-independent responses to phase-specific aggregation pheromone in adult desert locusts, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). **Physiological Entomology**, Oxford, v. 21, p. 131-137, 2008.

PARK, K. C.; OCHIENG, S. A.; ZHU, J.; BAKER, T. C. Odor discrimination using insect electroantennogram responses from an insect antennal array. **Chemical Senses**, Oxford, Inglaterra, v. 27, n. 4, p. 343-352, 2002.

ROELOFS, W. L. Attractive and aggregation pheromones. In: NORDLUND, D. A.; JONES, R. L.; LEWIS, W. J. (Ed.). **Semiochemicals: their role in pest control**. New York: Wiley, 1980.

RUIZ-MONTIEL, C.; GARCÍA-COAPIO, G.; ROJAS J. C.; MALO, E. A.; CRUZ-LÓPEZ, L.; DEL REAL, I.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, V. Aggregation pheromone of the agave weevil, *Scyphophorus acupunctatus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 127, p. 207-217, 2008.

SANTOS, P. H. R.; OLIVEIRA, V. L.; BORGES, M.; MORAES, M. C. B.; SUJII, E. R.; LAUMANN, R. Identificação dos voláteis da *Lagenaria vulgaris* (SER.) (Cucurbitaceae) e seu potencial para o manejo de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1924) (Coleoptera: Chrysomelidae). In: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 9., 2004, Brasília, DF. **Anais: resumos e trabalhos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. p. 139.

SCHNEIDER, D. Physiological investigation on the antennal receptors of the silk moth during chemical and mechanical stimulation. **Experientia**, Basel, Suíça, v. 13, p. 89-91, 1957.

SILVERSTEIN, R. M. Pheromones: background and potential use in insect pest control. **Science**, Washington, v. 213, p. 1326-1332, 1981.

SINDAG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Disponível em: < <http://www.sindag.com.br/> >. Acesso em: 2007.

STENGL, M.; ZIEGELBERGER, G.; BOEKHOFF, I.; KRIEGER, J. Perireceptor events and transduction mechanisms in insect olfaction. In: HANSSON, B. S. **Insect olfaction**. Berlin: Springer: 1999. p. 50-66.

STENSMYR, M. C.; ERLAND, S.; HALLBERG, E.; WALLÉN, R.; GREENAWAY, P.; HANSSON, B. S. Insect-like olfactory adaptations in the terrestrial Giant Robber Crab. **Current Biology**, London, v. 15, p. 116-121, 2005.

VOGT, R. G.; CALLAHAN, F. E.; ROGERS, M. E.; DICKENS, J. C. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as Indicated by LAP, an OBP-related protein of the true Bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). **Chemical Senses**, Oxford, Inglaterra, v. 24, p. 481-495, 1999.

WILLIAMS, L; RODRIGUEZ-SAONA, C.; CASTLE, S. C.; ZHU, S. EAG-active herbivore-induced plant volatiles modify behavioral responses and host attack by an egg parasitoid. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 34, p. 1190-1201, 2008.

ZACHARUK, R. Y. Antennae and sensilla. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**, Oxford: Pergamon, 1985. v. 4, p.1-69.