

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0604617-7 B1

(22) Data do Depósito: 19/10/2006

(45) Data de Concessão: 05/01/2016
(RPI 2348)



* B R P I 0 6 0 4 6 1 7 B 1 *

(54) Título: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA ATRAÇÃO E EXTERMÍNIO DE PERCEVEJOS DO GÊNERO TIBRACA

(51) Int.Cl.: A01N 31/06; C07C 35/00

(73) Titular(es): EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA

(72) Inventor(es): MIGUEL BORGES, MARIA CAROLINA BLASSIOLI MORAES, RAUL ALBERTO LAUMANN, JOSÉ ALEXANDRE FREITAS BARRIGOSI

COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA ATRAÇÃO E EXTERMÍNIO DE PERCEVEJOS DO GÊNERO *TIBRACA*

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção está relacionada à composições e métodos para atração, armadilhamento e/ou extermínio dos percevejos do gênero *Tibraca*, preferencialmente *Tibraca limbativentris*, praga de culturas agrícolas.

Zingiberenol (1RS, 4RS, 1'RS)-4-(1', 5'-dimetilhex-4'-enil)-1-metilciclohex-2-en-1-ol) utilizado como feromônio atraente químico em combinação com adjuvantes e armadilhas ou entoxicantes oferece um eficiente controle desses insetos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

No Brasil a perda anual da produção de arroz devido ao ataque de insetos é estimada em 10%. Dentre as pragas do arroz se destaca o percevejo-do-colmo, *Tibraca limbativentris* Stal.

O percevejo-do-colmo, *T. limbativentris*, é muito prejudicial para a cultura do arroz e tem apresentado alta incidência em alguns anos, em lavouras comerciais, com focos de até 200 percevejos/m², provocando perdas na produção de 5% a 80% (Ferreira, E.; Zimmermann, F.J.P.; dos Santos, A.B.; das Neves, B.P. 1997. O percevejo-do-colmo na cultura do arroz. Goiânia: Embrapa-CNPAP, 43p. Documentos, 75). O inseto está distribuído na maioria dos estados do Brasil e possui alguns hospedeiros alternativos. O dano é caracterizado pela morte parcial ou total da parte central dos colmos, em consequência da alimentação do inseto a partir do segundo ínstar. A picada do inseto na base das plantas, na fase vegetativa, provoca o aparecimento do sintoma conhecido por “coração-morto” e na fase reprodutiva, origina o sintoma conhecido por “panícula-branca”.

Estudos realizados com alguns cultivares de arroz, sob diferentes populações de machos de *T. limbativentris*, mostraram que infestações na fase reprodutiva aumentam o número de grãos quebrados e gessados e que 1 percevejo/m² na fase vegetativa, provoca redução na produção de grãos correspondente a 58,7 kg/ha. Com o mesmo nível de infestação na fase reprodutiva, a perda na produção de grãos é equivalente a 65,2 kg/ha

(Ferreira, E.; Zimmermann, F.J.P.; dos Santos, A.B.; das Neves, B.P. 1997. O percevejo-do-colmo na cultura do arroz. Goiânia: Emprapa-CNPAF, 43p. Documentos, 75).

Como parte de um sistema de manejo integrado de pragas, o uso de semioquímicos pode conduzir a novas oportunidades no controle de praga. Um atraente químico para percevejo, especialmente para *Tibraca limbativentris*, seria valioso para o monitoramento desta praga. Adicionalmente, os atraentes podem ser úteis para concentrar percevejos em armadilhas localizadas em áreas plantadas com variedades precoces, onde poderiam, dessa forma, ser economicamente controlados com uma aplicação limitada de inseticida (Mcpherson, R.M. & Newson, L.D. 1984. Trap crops for control of stink bugs in soybeans. Journal Georgia Entomological Society, 19, 470-480).

Os feromônios atraentes foram identificados para alguns pentatomídeos, como *Nezara viridula* [Baker, R., M. Borges, N.G. Cooke & R.N. Herbert. 1987. Identification and synthesis of (Z)-(1'S,3'R,4'S)(-)-2-(3',4'-epoxy-4'-methylcyclohexyl)-6-methylhepta-2,5-iene, the sex pheromone of the southern green stinkbug, *Nezara viridula* (L.). Chem. Commun. 414-416], *Euschistus heros* [Borges, M. & Aldrich, J.R. (1994) Attractant pheromone for Nearctic stink bug, *Euschistus obscurus* (Heteroptera: Pentatomidae): insight into a Neotropical relative. Journal of Chemical Ecology, 20, 1095-1102, Aldrich, J.R., Oliver, J.E., Lusby, W.R., Kochansky, J.P. & Borges, M. (1994) Identification of male-specific volatiles from Nearctic and Neotropical stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). Journal of Chemical Ecology, 20, 1103-1111] e *Thyanta perditor* [Moraes, M.C.B., Millar, J., Laumann, R.A., Sujii, E.R., Pires, C.P.S. & Borges, M. 2005. Sex Attractant Pheromone from the Neotropical Red-Shouldered Stink Bug, *Thyanta perditor* (F.). J. Chem. Ecol. 31: 1405-1417].

Vários feromônios já identificados estão sendo utilizados para atração de insetos-praga, reduzindo desse modo as perdas agrícolas causadas por esse tipo de praga, como é o caso dos feromônios para atração de artrópodes (PI00102423), besouros (US6958360, US6440406, US6703014), percevejos (PI99035090, US4981981, US5447718), entre outros. Os documentos US6958360 e US6703014 referem-se a composições e métodos empregando um feromônio de atração para o besouro da batata do Colorado. A patente US6440406 relata a utilização do feromônio

para atração de escarabeídeos adultos pertencentes às espécies de *Phyllophaga*, *Cotinis*, *Diplotaxis*, *Cyclocephala* e *Macroductylus*, fornecendo proteção às plantas suscetíveis aos escarabeídeos. O documento PI99035090 descreve composições e métodos empregando um feromônio para atração, armadilhamento e/ou extermínio da praga de culturas agrícolas *Piezodorus guildinii*, um membro importante do complexo de percevejos da soja. A patente US5447718 diz respeito a composições e métodos envolvendo feromônios para atrair insetos do gênero *Euschistus* e desse modo fazer um controle eficiente da praga em lavouras suscetíveis.

Apesar da grande quantidade de feromônios descritos do estado da técnica, não existe nenhum relato de um feromônio atraente para o gênero *Tibraca* e muito menos para a espécie *Tibraca limbativentris*, praga de extrema importância para a lavoura de arroz. A presente invenção relata a utilização do componente sintético, zingiberenol, que faz parte da mistura feromonal de *T. limbativentris*, em uma composição eficiente para atração das fêmeas de *T. limbativentris*. Um método de utilização dessa composição também é relatado na presente invenção, visando o controle desses insetos-praga em culturas suscetíveis.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a composições e métodos para atrair, capturar em armadilhas e/ou exterminar percevejos do gênero *Tibraca*, preferencialmente *Tibraca limbativentris*.

Uma das concretizações da presente invenção diz respeito a uma composição atrativa caracterizada por compreender:

- a. zingiberenol (1*RS*, 4*RS*, 1'*RS*)-4-(1',5'-dimetilhex-4'-enil)-1-metilciclohex-2-en-1-ol) em uma concentração efetiva para atrair percevejos do gênero *Tibraca*;
- b. adjuvantes; e opcionalmente
- c. uma quantidade eficaz de um entoxicante que seja suficiente para o extermínio de insetos do gênero *Tibraca*.

Uma segunda concretização da presente invenção diz respeito a uma composição pesticida caracterizada por compreender:

- a. zingiberenol (1*RS*, 4*RS*, 1'*RS*)-4-(1',5'-dimetilhex-4'-enil)-1-metilciclohex-2-en-1-ol) em uma concentração efetiva para atrair percevejos do gênero *Tibraca*;
- b. uma quantidade eficaz de um entoxicante que seja suficiente para o
- 5 extermínio de insetos do gênero *Tibraca*; e opcionalmente
- c. adjuvantes.

Uma terceira concretização da presente invenção diz respeito a um método de atração de percevejos do gênero *Tibraca* caracterizado pela aplicação de uma ou mais composições atrativas contendo zingiberenol (1*RS*, 4*RS*, 1'*RS*)-4-(1',5'-dimetilhex-4'-enil)-1-metilciclohex-2-en-1-ol) em uma concentração efetiva para atrair percevejos do

10 gênero *Tibraca* e, opcionalmente, adjuvantes.

Uma quarta concretização da presente invenção descreve um método para controlar a população de percevejos do gênero *Tibraca* caracterizado pela aplicação de uma ou mais composições atrativas contendo zingiberenol (1*RS*, 4*RS*, 1'*RS*)-4-(1',5'-dimetilhex-4'-enil)-1-metilciclohex-2-en-1-ol) e, opcionalmente adjuvantes, a uma área

15 afastada da infestação dos ditos percevejos cuja a concentração da composição atrativa é efetiva para mover a população de percevejos da área da infestação para outra designada.

Uma quinta concretização da presente invenção diz respeito a um método de extermínio de percevejos do gênero *Tibraca* caracterizado pela aplicação de uma ou mais composições atrativas contendo zingiberenol (1*RS*, 4*RS*, 1'*RS*)-4-(1',5'-dimetilhex-4'-enil)-1-metilciclohex-2-en-1-ol) em uma concentração efetiva para atrair

20 percevejos do gênero *Tibraca* juntamente com adjuvantes e uma quantidade eficaz de um entoxicante que seja suficiente para o extermínio de insetos do gênero *Tibraca*.

25 BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Cromatograma dos voláteis obtidos pela técnica da aeração coletados de machos (cromatograma superior) e fêmeas (cromatograma inferior) de *Tibraca limbativentris*. Cada pico representa as seguintes moléculas: 1) α -pineno; 2) β -pineno; 3) metil-5-hepten-2-ona; 4) decano; 5) limoneno; 6) (*E*)-2-octenal; 7) nonanal; 8) dodecano; 9) decanal; 10) tridecano; 11) α -copaeno; 12) tetradecano; 13) pentadecano;

30 14) hexadecano; 15 e 16) (1*RS*,4*RS*,1'*S*) zingiberenol.

Figura 2. Estrutura das moléculas de zingiberenol. A) Zingiberenol - I, contendo 4 isômeros (1*RS*,4*RS*,1'*R*)-4-(1',5'-dimetilhex-2'-enil)-1-metilciclohex-2-en-1-ol. B) Zingiberenol - II, contendo 4 isômeros (1*RS*, 4*RS*, 1'*S*)-4-(1',5'-dimetilhex-4'-enil)-1-metilciclohex-2-en-1-ol.

5 Figura 3. Cromatograma dos extratos contendo os voláteis liberados pelos machos de *T. limbativentris* coletados nas aerações (cromatogramas inferiores), e do padrão sintético de zingiberenol contendo os diastereoisômeros (cromatogramas superiores). A) coluna polar, DB-wax e B) coluna apolar, HP-1. Picos de números 1 e 2 indicam os isômeros do zingiberenol.

10 Figura 4. Cromatogramas mostrando os quatro isômeros do zingiberenol silanizado ($C_{15}H_{28}O-TMS$) (A) e os três picos obtidos do extrato de machos de *T. limbativentris* derivatizado (B).

Figura 5. Olfatômetro utilizado para estudos comportamentais de *Tibraca limbativentris*. CT = Câmara tratamento. CC = Câmara Controle. CL = Câmara de
15 liberação. Setas indicam a direção do ar.

Figura 6. Porcentagem de resposta de fêmeas em bioensaios realizados em olfatômetro “Y” com a mistura sintética, racêmica, do zingiberenol hexano como controle. A) Controle (n-hexano), B) Zingiberenol. Significância estatística das respostas ao tratamento e controle: Teste chi-quadrado $\chi^2_{1:19,05}$ $p < 0,001$. Número de insetos
20 avaliados: 84.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção relata uma nova composição e método para atração e manipulação de percevejos do gênero *Tibraca*, preferencialmente, mas não limitado a espécies de *Tibraca limbativentris*. O método emprega o uso de composições químicas
25 que agem como atrativo intraespecífico para manipular um número significativo de percevejos do gênero *Tibraca*. As composições são providas em concentrações efetivas capazes de induzir respostas significativas em percevejos.

As composições químicas da presente invenção incluem semioquímicos que atraem ou auxiliam na atração de percevejos. Para propósito da presente invenção os
30 semioquímicos incluem os feromônios produzidos pelo percevejo *Tibraca limbativentris*. Mais especificamente o feromônio da presente invenção é o composto

químico zingiberenol contendo seus oito possíveis estereoisômeros. Esses estereoisômeros são divididos em dois grupos e cada grupo contém quatro diastereoisômeros chamados de Zingiberenol I (1*RS*, 4*RS*, 1'*R*)-4-(1',5'-dimetilhex-4'-enil)-1-metilciclohex-2-em-1-ol) e Zingiberenol II (1*RS*, 4*RS*, 1'*S*)-4-(1',5'-dimetilhex-4'-enil)-1-metilciclohex-2-em-1-ol). O feromônio da presente invenção atrai fêmeas do gênero *Tibraca*.

Feromônios são um grupo de compostos orgânicos produzidos por insetos cuja função é a comunicação entre indivíduos da mesma espécie ou são atraentes sexuais. O feromônio pode ser utilizado como um atraente químico em armadilhas no campo e constitui um meio valioso para ser utilizado no monitoramento, em campo, da praga específica. O feromônio pode ser utilizado isoladamente ou com veículos líquidos e/ou sólidos. Veículos líquidos que podem ser utilizados para formar composições utilizando feromônio da presente invenção podem ser, mas não estão limitados a água ou solventes orgânicos, tais como polióis, ésteres, cloreto de metileno, álcool, ou óleo vegetal. Óleos vegetais podem incluir, mas não estão limitados a óleo de oliva, óleo de sésamo, óleo de amendoim, óleo de canola, óleo de semente de algodão, óleo de milho, óleo de soja, óleo mineral, bem como formas metiladas desses óleos, ou mistura deles. Solventes hidrocarbonetos lineares e aromáticos também podem ser incluídos. A mistura contendo o feromônio pode também ser incorporada a ingredientes sólidos, que incluem mas não estão limitados a argila, sílica, cloreto de polivinil, poliestireno, poliuretano, condensado de ureaformaldeído, e amido. A quantidade da mistura racêmica do zingiberenol (1*RS*, 4*RS*, 1'*RS*)-4-(1',5'-dimetilhex-4'-enil)-1-metilciclohex-2-em-1-ol), com os oito isômeros, ou a quantidade de qualquer um dos seus isômeros isolados ou combinados, podem estar em qualquer concentração da faixa de 0,001 a 10000mg/ml. Preferencialmente, a concentração da mistura racêmica ou de seus isômeros isolados ou combinados que apresentou melhores resultados é a de 0,1 a 0,4 mg/ml.

A composição atraente pode ser ainda formulada com uma variedade de componentes opcionais ou adjuvantes, incluindo mas não limitado a voláteis de plantas, estimulantes de alimentação tais como melado, outros atraentes de insetos tais como feromônios, sexuais, ou entoxicantes (inseticidas).

Outros componentes que podem ser incluídos na formulação incluem umectantes, preservativos, espessantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes,

emulsificadores, polímeros formadores de filme e misturas destes. Umectantes podem incluir polióis, açúcares (tais como melaço), glicóis e sais higroscópicos. Membranas vítreas, polímeros formadores de filmes incluem goma rosina, látex, pirrolidona polivinil, álcool polivinil, cloreto polivinil, polietileno, acetato de polivinil, e misturas
 5 destes. Aditivos opcionais adicionais incluem metil, metalcrilato, e misturas destes.

Uma outra concretização da presente invenção inclui uma composição pesticida contendo a mistura racêmica do zingiberenol (1*RS*, 4*RS*, 1'*RS*)-4-(1',5'-dimetilhex-4'-enil)-1-metilciclohex-2-em-1-ol), com os oito isômeros, ou qualquer um dos seus isômeros isolados ou combinados e adjuvantes, juntamente com toxicantes para insetos
 10 ou pesticidas que sejam altamente tóxicos para os insetos, mas que esteja em quantidade suficiente para não inibir a atração ou a resposta de alimentação quando combinada com uma fonte alimentar e aplicada em plantas ou armadilhas.

Entoxicantes podem ser incluídos na composição atrativa e podem ser sintéticos ou naturais incluindo mas não estando limitados a inseticidas tais como carbaril,
 15 metomil, acefato, tiodicarbamida, ciflutrina, malation, clorpirifós, benzoato de emamectina, abamectina, spinosad, endossulfano, e misturas destes. Bactérias, fungos, e vírus ou outros patógenos podem também ser incluídos nas composições, bem como reguladores de crescimento de insetos ou compostos elicitando modificação de comportamento ou interrompendo funções fisiológicas. As composições atrativas podem
 20 ser utilizadas de diversas formas, incluindo o monitoramento ou controle de populações de insetos. Em um dos aspectos da invenção, a composição pode ser colocada dentro de armadilhas para monitorar mudanças populacionais. O monitoramento preciso permitirá a aplicação dos inseticidas próximo ao período da eficácia de tratamento máxima, evitando desse modo a aplicação de inseticida em situações onde a população de insetos
 25 é baixa. Em um dos aspectos da presente invenção o método de controle e/ou monitoramento populacional dos percevejos do gênero *Tibraca* consiste na aplicação de uma ou mais composições atrativas contendo zingiberenol (1*RS*, 4*RS*, 1'*RS*)-4-(1',5'-dimetilhex-4'-enil)-1-metilciclohex-2-en-1-ol) e adjuvantes em uma área afastada da infestação dos ditos percevejos cuja a concentração da composição atrativa é efetiva
 30 para mover a população de percevejos da área da infestação para outra designada .

Em outro aspecto da invenção, a composição atrativa pode ser usada para controlar população de pragas através do emprego de um grande número de armadilhas,

ou através da combinação de uma quantidade efetiva de um entoxicante (toxicante de inseto) ou pesticida para matar percevejos conforme descrito anteriormente. A presente invenção engloba ainda um método de extermínio de percevejos do gênero caracterizado pela aplicação de uma ou mais composições contendo zingiberenol (1*RS*, 4*RS*, 1'*RS*)-4-(1',5'-dimetilhex-4'-enil)-1-metilciclohex-2-en-1-ol) em uma concentração efetiva para atrair percevejos do gênero *Tibraca* juntamente com adjuvantes e uma quantidade eficaz de um entoxicante que seja suficiente para o extermínio de insetos do gênero *Tibraca*.

Uma armadilha é definida na presente invenção como sendo qualquer dispositivo onde podem ser colocadas as composições da presente invenção e que impeça os insetos de escaparem uma vez em contato com o dispositivo.

Em outro aspecto da invenção a composição atrativa pode ser incluída como parte de uma armadilha ou outro suporte sólido, junto a um estimulante alimentício, e/ou um inseticida, pesticida ou outro agente mecânico, tóxico ou biologicamente ativo (fungos, bactérias ou qualquer microrganismo entomopatogênico) ou para eliminar, reduzir ou prevenir a reprodução das espécies de insetos-alvo.

É previsto que os feromônios da presente invenção e/ou composição atrativa possam ser utilizados em conjunto com qualquer tipo de armadilha apropriada ou disseminador atrativo conhecido no estado da técnica. Os feromônios podem ser aplicados ou disseminados usando uma variedade de técnicas convencionais, tais como em uma solução exposta, impregnados dentro de um material substrato, ou impregnado em um dispensador similar àqueles às vezes usado como dispensadores de desodorantes. Além disso, os componentes da composição atrativa podem ser combinados em um simples dispensador provido dentro de uma simples armadilha, ou provido separadamente em uma pluralidade de dispensadores, todos dentro de uma simples armadilha. O feromônio pode ser aplicado como um dispositivo não diluído, ou formulado em um veículo inerte/adjuvante. Métodos de uso da composição atrativa da presente invenção incluem a aplicação separada de uma mistura de inseticida-estimulante em plantas através de métodos conhecidos no estado da técnica, técnica conhecida como atrai-mata com o posicionamento da composição atrativa de maneira que as espécies do percevejo *Tibraca* sejam atraídas pela mistura inseticida-estimulante (Entomology & Pest Management Larry P. Pedigo, Ed. Prentice Hall 1996, USA). A

composição atrativa pode ser aplicada em ou sobre grânulos, dispensadores poliméricos, vitreos, tecidos, ou de feltro, por exemplo, e pode ser aplicada paralelamente com pulverizadores contendo a mistura inseticida-estimulante.

Uma outra concretização da invenção é a utilização dos feromônios ou composição atrativa/pesticida para manipulação do comportamento de insetos agentes de biocontrole (insetos benéficos), como os parasitóides de ovos das famílias *Scelionidae* e *Encyrtidae* incrementando a mortalidade da praga causada por estes inimigos naturais em agroecossistemas.

Plantas que podem ser protegidas dos percevejos do gênero *Tibraca* incluem, mas não estão limitadas a plantas importantes agronomicamente e cultivares como o arroz, soja, tomate, trigo e gramíneas em geral.

Na prática de qualquer uma das concretizações supra citadas, um atrativo é usado como isca na armadilha ou é então aplicado no lugar de ou na vizinhança da infestação em uma quantidade efetiva para atrair os insetos-alvo. Fatores tais como densidade populacional, precipitação, temperatura, velocidade do vento, e taxa de liberação influenciará o número de insetos presos.

Os exemplos que seguem servem apenas para ilustrar a invenção e não têm a intenção de limitar o escopo da invenção, o qual é definido pelas reivindicações.

EXEMPLO 1

Isolamento dos Feromônios

Adultos de *Tibraca limbativentris* foram obtidos de colônias da Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia-Goiás (16° 4' S e 49° 14' W). Os insetos foram criados em plantas de arroz, *Oryza sativa*, plantadas em vasos de 5 litros e mantidos em casas de vegetação. Em laboratório, para bioensaios e coleta de voláteis, os insetos foram criados em caixas plásticas de 5 litros e a alimentação renovada três vezes por semana [Cavalcante, A. C. S., Cordeiro, D. M., Laumann, R. A., Moraes, M. C. B., Barrigossi, J. A. and Borges, M. 2004. Ciclo de vida e metodologia de criação de *Tibraca limbatriventris* Stal. 1860 (Heteroptera: Pentatomidae) para estudos de ecologia química. Brasília: Embrapa, Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004, 18p. (*Embrapa-Cenargen, Boletim de Pesquisa*, 78)]. As colônias foram mantidas em laboratório sob

temperatura de $26,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65 \pm 10\%$, com 14:10 hr de fotoperíodo.

Os extratos contendo os voláteis foram coletados de grupos de 15 insetos adultos, machos ou fêmeas, virgens ($n = 50$ grupos/sexo), de idades conhecidas. Com a acomodação destes percevejos em uma coluna de vidro de 1 litro, os voláteis foram capturados do ar em adsorventes químicos (SUPER Q, Alltech). O tubo contendo o adsorvente foi conectado à coluna de vidro e à uma bomba de vácuo (0,8 litros/min.) que força a passagem do ar pela coluna e pelo adsorvente. O ar foi filtrado através de um filtro de carvão ativado de 30 mg, e cada extração ocorreu por um período de 24 hr.

Os adsorventes foram eluídos com 2 ml de *n*-hexano e armazenados sob -20°C (Borges, M. & Aldrich, J.R. 1994. Attractant pheromone for Nearctic stink bug, *Euschistus obscurus* (Heteroptera: Pentatomidae): insight into a Neotropical relative. Journal of Chemical Ecology, 20, 1095-1102).

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a um detector por ionização de chama (Perkin Elmer-Autosystem XL) equipado com uma coluna não polar DB-5 (30 m x 0.25 mm ID, 0.25 μm) e usando um programa de temperatura operado a 50°C durante 2 min, aumentada para 250°C a uma taxa de $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e mantido nesta temperatura por 5 min. Com esta metodologia foi possível detectar dois compostos exclusivos dos extratos de machos. Como nos pentatomídeos estudados até o momento, quem libera o feromônio sexual é o macho da espécie, esforços foram realizados no sentido de identificar os dois compostos (Nos. 15 e 16 – Figura 1) produzidos pelos machos de *T. limbiventris*.

EXEMPLO 2

Identificação dos Componentes Feromonais.

Para identificação da estrutura química dos compostos 15 e 16 (Figura 1), dos extratos de machos, de *T. limbiventris*, foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) utilizando um Thermo-Finnigan MAT95XP equipado com uma coluna não-polar DB-1 (50 m x 0.25 mm ID, 0.25 μm) e usando um programa de temperatura operado a 30°C durante 1 min, aumentada para $150^{\circ}\text{C}/0,1\text{min.}$, a uma taxa de $5^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ e finalmente a 250°C a uma taxa de $10^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ e

mantido nesta temperatura por 20 min. A ionização foi realizada por impacto de elétrons (70 eV, fonte de temperatura 200°C).

O padrão de fragmentação obtido para estes dois compostos foi muito semelhante ao padrão de fragmentação do composto zingiberenol, quando foram analisados pelo banco de dados de fragmentos de massas da biblioteca do National Institute of Standards and Technology USA, (NIST).

Padrões de zingiberenol foram sintetizados, seguindo a metodologia de Hagiwara et al (Hagiwara, H.; Okabe, T.; Ono, H.; Kamat, V.P.; Hoshi, T.; Suzuki, T.; and Ando, M. 2002. Total synthesis of bisabolane sesquiterpenoids, α -bisabol-1-one, curcumene, curcuphenol and elvirol: utility of catalytic enamine reaction in cyclohexenone synthesis. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*: 895-900), em dois grupos contendo quatro diastereoisômeros cada um, Zingiberenol I (Z-I) e Zingiberenol II (Z-II) (Figura 2), separando, desta forma, os enantiômeros.

Os dois compostos, 15 e 16, (Figura 1) tiveram suas identidades duplamente checadas pela co-injeção, no cromatógrafo gasoso, dos extratos naturais com padrões sintetizados (Hagiwara, H.; Okabe, T.; Ono, H.; Kamat, V.P.; Hoshi, T.; Suzuki, T.; and Ando, M. 2002. Total synthesis of bisabolane sesquiterpenoids, α -bisabol-1-one, curcumene, curcuphenol and elvirol: utility of catalytic enamine reaction in cyclohexenone synthesis. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*: 895-900). A análise por espectrometria de massas mostrou que os compostos 15 e 16 apresentam o mesmo padrão de fragmentação dos isômeros do zingiberenol.

A molécula de zingiberenol tem três centros quirais, posições 1', 1 e 4, (Figura 2), assim sendo, há oito isômeros possíveis. Sendo que quatro deles são enantiômeros e quatro deles são diastereoisômeros. A solução Z-I e Z-II contém quatro diastereoisômeros cada e os isômeros de Z-I são enantiômeros dos isômeros presentes em Z-II. Os enantiômeros não são separados em colunas aquirais porque eles têm as mesmas propriedades físico-químicas e desta forma o mesmo tempo de retenção. Embora, diastereoisômeros, no geral, são separados em colunas aquirais, para os diastereoisômeros presentes em Z-I e Z-II foi possível separar somente dois diastereoisômeros, dos quatro presentes em cada solução (Figura 3). Assim sendo, foi conduzida uma derivatização para obter uma melhor separação dos diastereoisômeros em uma coluna aquiral (colunas do tipo 100% dimethylpolysiloxane ou 5% phenyl, 95% dimethylpolysiloxane).

A derivatização foi conduzida usando *N*-metil-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSFTA) com o extrato de aeração de macho e com as soluções de zingiberenol I e II. A análise por cromatografia gasosa do extrato de macho derivatizado mostrou que os compostos 15 e 16 desapareceram e que três novos compostos foram gerados (Figura 4).

- 5 Co-injeção com solução de zingiberenol I e II derivatizada com MSFTA, confirmou que cada solução continha quatro diastereoisômeros e que os compostos no extrato de macho co-eluíram com os compostos nas soluções Z-I e Z-II derivatizados. Adicionalmente, análises por espectrometria de massas das soluções de zingiberenol I e II, derivatizadas, e dos extratos de machos, derivatizados, mostraram que o padrão de fragmentação dos
- 10 compostos foi muito similar.

EXEMPLO 3

Teste Comportamental

- Os bioensaios foram conduzidos em olfatômetros de dupla escolha, modificado de Borges & Aldrich (Borges, M. & Aldrich, J.R. 1994 Attractant pheromone for
- 15 Nearctic stink bug, *Euschistus obscurus* (Heteroptera: Pentatomidae): insight into a Neotropical relative. *Journal of Chemical Ecology*, 20, 1095-1102) para o teste da atividade biológica dos compostos voláteis sintéticos.

- A câmara de liberação do olfatômetro consistiu de um frasco de 500-ml com três entradas. Dois evaporadores rotatórios de 250-ml conectados em cada lado da câmara
- 20 de liberação formaram os braços do tratamento e controle do olfatômetro. O ar foi filtrado, através de filtro de carvão ativado, e umidificado, com água destilada, antes de entrar no olfatômetro. A entrada central da câmara de liberação foi conectada a uma bomba de vácuo ajustada a velocidade de 0,8 litros por min., com um medidor de vazão (Figura 5).

- 25 Fêmeas foram colocadas, individualmente, na câmara de liberação e mantidas, sem circulação de ar, por um período de 5 min. para adaptação. Após esse período os estímulos (feromônios) foram colocados nas extremidades das câmaras de tratamento e controle e a bomba de vácuo foi ligada. O ar flui entrando pelas câmaras de tratamento e controle, levando os odores para a câmara de liberação, onde os odores estão
- 30 misturados, de forma que o inseto tende a escolher o braço do olfatômetro que apresenta o estímulo atraente. Cada bioensaio tem a duração de 15 min., sendo avaliada a escolha

do inseto pelo braço do olfatômetro de tratamento ou controle. A escolha é considerada positiva quando o inseto entra em um dos braços e permanece ali por um período maior a 30 segundos.

5 Bioensaios com o composto zingiberenol (sintético) em hexano, foram conduzidos para comparar respostas das fêmeas da espécie para dois grupos de isômeros do zingiberenol, ou seja, zingiberenol I e zingiberenol II. Os resultados demonstraram que atração das fêmeas de *T. limbativentris* foi obtida com a mistura racêmica do zingiberenol como mistura feromonal (Figura 6). O que significa que, apesar do inseto produzir somente três estereoisômeros, pode-se utilizar a mistura racêmica para a sua
10 atratividade.

As concentrações testadas e que produziram maior resposta do inseto foram 0,1 a 0,4 mg/ml, contudo obtiveram-se respostas positivas ao zingiberenol sintético na faixa de 0,001 a 10.000 mg/ml.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição atrativa caracterizada por compreender:
 - a. Zingiberenol (1RS, 4RS, 1'RS)-4-(1',5'-dimetilhex-4'-enil)-1-metilciclohex-2-en-1-ol) em uma concentração efetiva para atrair percevejos do gênero *Tibraca*;
 - b. Adjuvantes selecionados dentre grupos de voláteis de plantas, estimulantes de alimentação, atraentes de insetos, umectantes, preservativos, espessantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes, emulsificadores, polímeros formadores de filme, solventes aquosos e/ou orgânicos usados para a formulação e misturas destes e; opcionalmente
 - c. Uma quantidade eficaz de um entoxicante selecionado dentre inseticida químico natural ou sintético, ou agente de biocontrole.
2. Composição atrativa de acordo com a Reivindicação 1 caracterizada pelo fato do zingiberenol estar na forma de uma mistura racêmica ou na forma de qualquer um dos seus isômeros isolados ou combinados entre si.
3. Composição atrativa de acordo com a Reivindicação 1 caracterizada pelo fato da concentração efetiva de zingiberenol estar entre 0,001 a 10000 mg/ml.
4. Composição atrativa de acordo com a Reivindicação 1 caracterizada pelo fato do entoxicante ser um inseticida químico natural ou sintético selecionado dentre carbaril, metomil, acefato, tiodicarbamida, ciflutrina, malation, clorpirifós, benzoato de emamectina, abamectina, spinosad, endossulfano, e misturas destes.
5. Composição pesticida caracterizada por compreender:
 - a. Zingiberenol (1RS, 4RS, 1'RS)-4-(1',5'-dimetilhex-4'-enil)-1-metilciclohex-2-en-1-ol) em uma concentração efetiva para atrair percevejos do gênero *Tibraca*;
 - d. Uma quantidade eficaz de um entoxicante selecionado dentre inseticida químico natural ou sintético, ou agente de biocontrole e; opcionalmente
 - b. Adjuvantes selecionados dentre grupos de voláteis de plantas, estimulantes de alimentação, atraentes de insetos, umectantes, preservativos, espessantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes, emulsificadores, polímeros formadores de filme, solventes aquosos e/ou orgânicos usados para a formulação e misturas destes.
6. Composição pesticida de acordo com a Reivindicação 5 caracterizada pelo fato do entoxicante ser um inseticida químico natural ou sintético selecionado dentre carbaril, metomil, acefato, tiodicarbamida, ciflutrina, malation,

clorpirifós, benzoato de emamectina, abamectina, spinosad, endosulfano, e misturas destes.

7. Composição pesticida de acordo com a Reivindicação 5 caracterizada pelo fato do zingiberenol estar na forma de uma mistura racêmica ou na forma de qualquer um dos seus isômeros isolados ou combinados entre si.
8. Composição pesticida de acordo com a Reivindicação 5 caracterizada pelo fato da concentração efetiva de zingiberenol estar entre 0,001 a 10000 mg/ml.
9. Método de atração de percevejos do gênero *Tibraca* caracterizado pela aplicação da composição definida na Reivindicação 1 em uma concentração efetiva para atrair percevejos do gênero *Tibraca*.
10. Método de acordo com a Reivindicação 9 caracterizado pelo fato do atraente zingiberenol estar na forma de mistura racêmica ou em qualquer um dos seus isômeros isolados ou combinados entre si.
11. Método de acordo com a Reivindicação 9 caracterizado pelo fato da concentração efetiva de zingiberenol estar entre 0,001 a 10000 mg/ml.
12. Método para controlar a população de percevejos do gênero *Tibraca* caracterizado pela aplicação da composição atrativa definida na Reivindicação 1, a uma área afastada da infestação dos ditos percevejos cuja a concentração da composição atrativa é efetiva para mover a população de percevejos da área da infestação para outra designada.
13. Método de acordo com a Reivindicação 12 caracterizado pelo fato da concentração efetiva de zingiberenol estar entre 0,001 a 10000 mg/ml.
14. Método de extermínio de percevejos do gênero *Tibraca* caracterizado pela aplicação da composição definida na Reivindicação 5, em uma concentração efetiva para atrair percevejos do gênero *Tibraca*.
15. Método de acordo com a Reivindicação 14 caracterizado pelo fato da concentração efetiva de zingiberenol estar entre 0,001 a 10000 mg/ml.
16. Método de acordo com a Reivindicação 14 caracterizado pelo fato do entoxicante ser um inseticida químico natural ou sintético selecionado dentre carbaril, metomil, acefato, tiodicarbamida, ciflutrina, malation, clorpirifós, benzoato de emamectina, abamectina, spinosad, endosulfano, e misturas destes.
17. Método de acordo com as Reivindicações 9, 12 e 14 caracterizado pelo fato da composição estar posicionada em uma armadilha para insetos ou outro suporte sólido.
18. Método de acordo com as Reivindicações 9, 12 e 14 caracterizado pelo fato da composição poder ser aplicada em ou sobre grânulos, dispensadores poliméricos, vítreos, tecidos ou com pulverizadores.

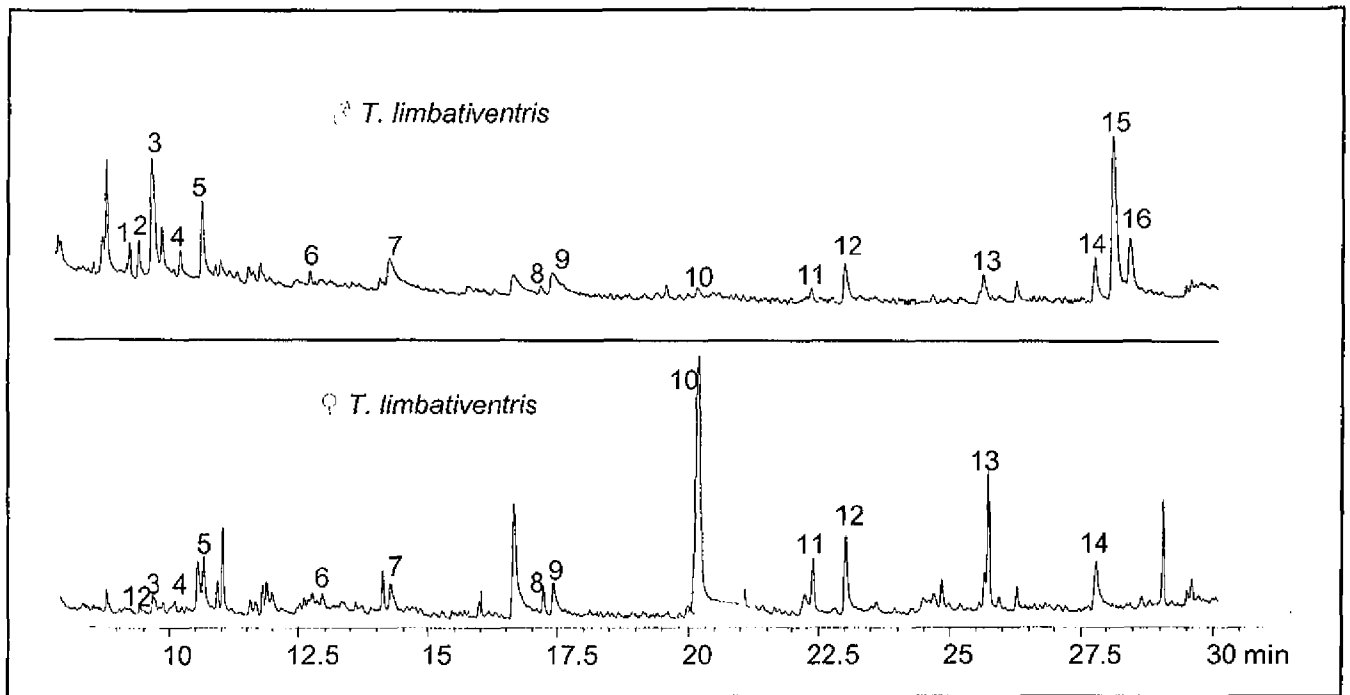
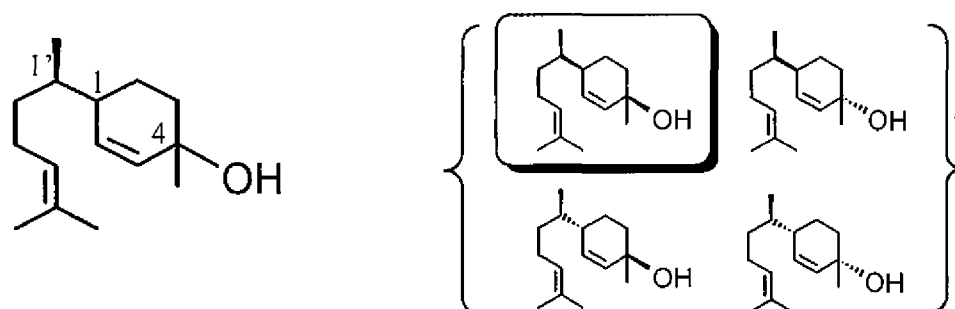
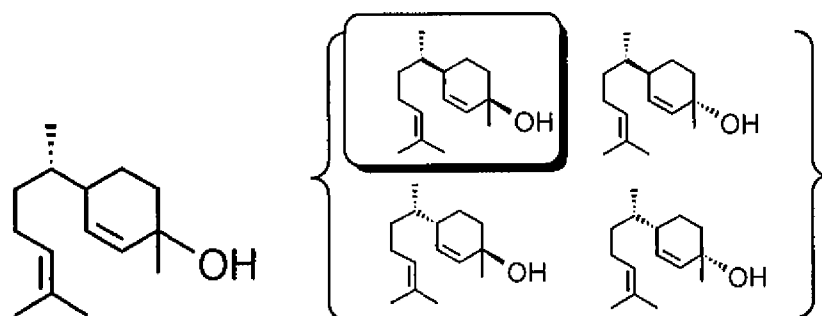
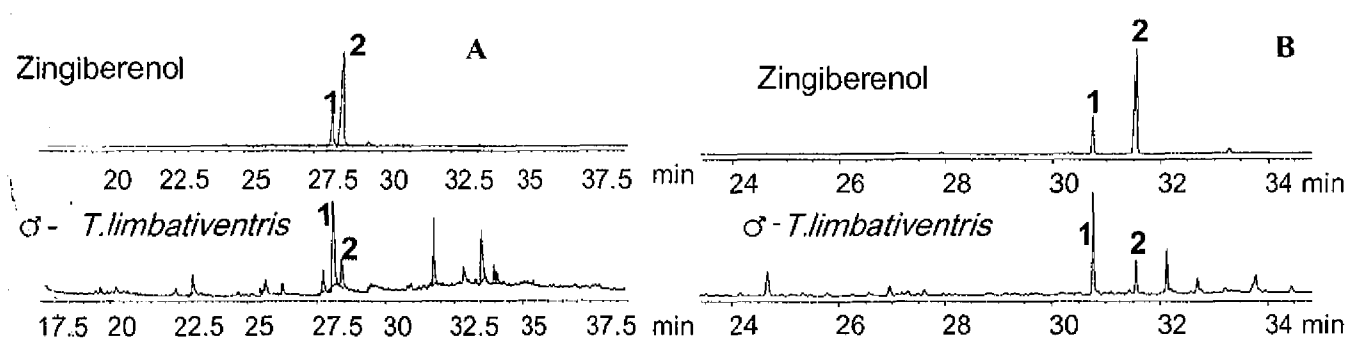
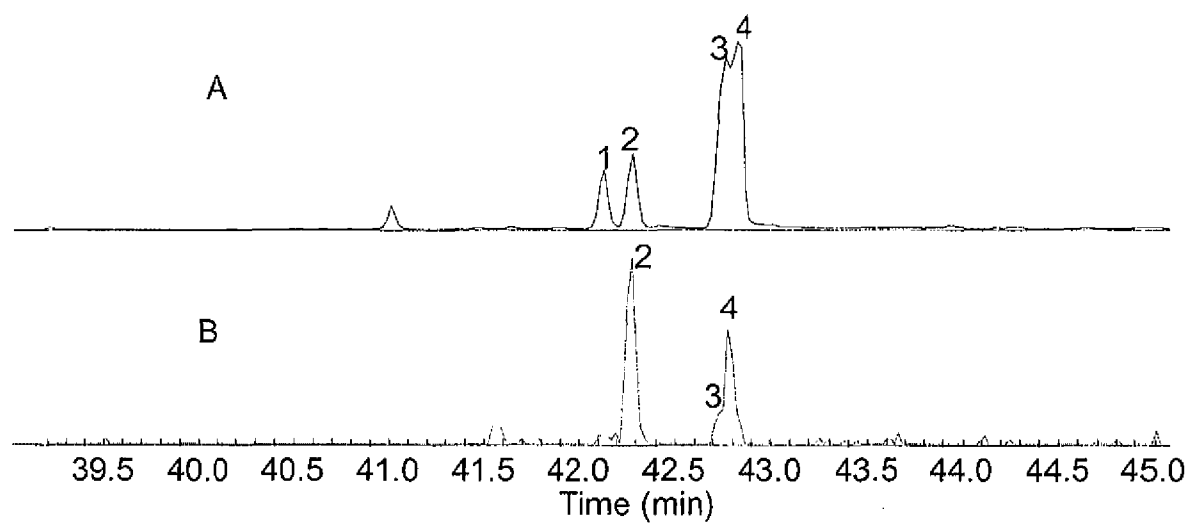
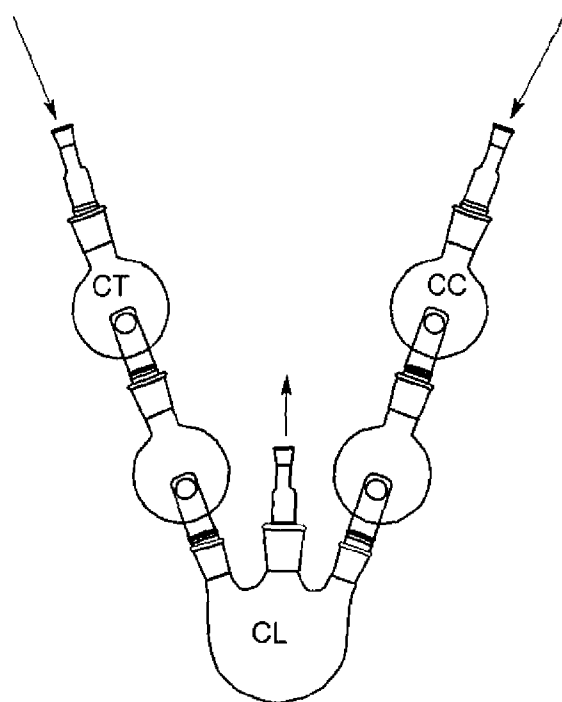


FIGURA 1

A**B****FIGURA 2**

**FIGURA 3**

**FIGURA 4**

**FIGURA 5**

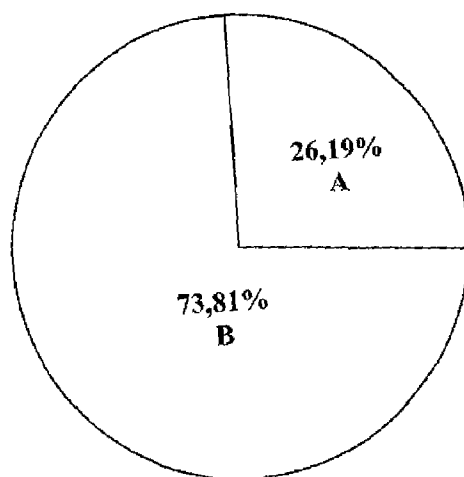


FIGURA 6

RESUMO**COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA ATRAÇÃO E EXTERMÍNIO DE
PERCEVEJOS DO GÊNERO TIBRACA**

Composições e métodos são descritos para a atração e subsequente captura e/ou
5 extermínio dos percevejos do gênero *Tibraca*, preferencialmente *Tibraca limbativentris*.

A mistura racêmica de zingiberenol (1*RS*, 4*RS*, 1'*RS*)-4-(1',5'-dimetilhex-4'-
enil)-1-metilciclohex-2-en-1-ol, ou um de seus componentes individualizados, utilizado
como um feromônio ou atraente químico, combinado com adjuvantes e uma armadilha
ou entoxicante, fornece um meio eficiente para o controle destes insetos em culturas
10 agrícolas.