



FRANCINE DE SOUZA ALVES DA FONSECA

**Ecologia Química de Percevejos da Família Phloeidae e
Oxirredutases de *Bacillus safensis* Isolado do Petróleo**

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

FRANCINE DE SOUZA ALVES DA FONSECA

**Ecologia Química de Percevejos da Família Phloeidae e
Oxirredutases de *Bacillus safensis* Isolado do Petróleo**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR FRANCINE
DE SOUZA ALVES DA FONSECA, E ORIENTADA PELA PROFA DRA. ANITA JOCELYNE
MARSAIOLI.**

Assinatura da Orientadora

**CAMPINAS
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

F733e Fonseca, Francine Souza Alves da (1979-).
Ecologia química de percevejos da família Phloeidae e Oxirredutases de *Bacillus safensis* isolado do petróleo / Francine Souza Alves da Fonseca. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Ecologia química. 2. Percevejos. 3. *Bacillus safensis*. 4. Oxirredutase. I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Phloeidae stink bugs chemical ecology and *Bacillus safensis* Oxidoreductases from petroleum

Palavras-chave em inglês:

Chemical Ecology
Stink Bugs
Bacillus safensis
Oxidoreductase

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Anita Jocelyne Marsaioli [Orientadora]
Andrés Gonzáles Ritzel
Suzan Pantaroto de Vasconcellos
Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda
Sebastião Ferreira Fonseca

Data de defesa: 12/03/2013

Programa de pós-graduação: Química

DEDICATÓRIA

*A Deus pelo dom da vida e sabedoria na arte de viver.
À minha mãe, exemplo de força e coragem.
Ao Sílvio, meu amado companheiro.
Aos que lutam por seus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de viver feliz e realizar os meus sonhos.

À minha família, principalmente a minha mãe por toda a dedicação, carinho e sabedoria. Meu agradecimento eterno ao meu companheiro inseparável, Sívio Andrezo, por todo o amor e compreensão.

À minha orientadora Profa. Dra. Anita J. Marsaioli, por ter aceitado o grande desafio da minha orientação. Por ter acreditado e confiado em mim, e respeitado as minhas limitações. Por toda sua dedicação exemplar e principalmente por me apresentar uma visão apaixonante das interações químicas e biológicas. Eternamente serei grata ao Sr. Antônio Marsaioli pela grande ajuda concedida na recolocação profissional do meu esposo aqui em Campinas.

Aos professores do Instituto de Química da Unicamp, em especial a Luzia Koike, Sebastião Fonseca, Paulo M. Imamura, Paulo J. S. Moran, José Augusto, Solange Cadore, Antônio Cláudio Herrera, Paulo Miranda, Fabio Gozzo e Marcos Zezzi pelas contribuições em exames de qualificação geral e de área, ensinamentos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos colaboradores, Professor Francisco Reis (IQ-UNICAMP), Anete Pereira de Souza (CBMEG-UNICAMP), Valéria Maia de Oliveira (CPQBA-UNICAMP), João Vasconcellos Neto (IB-UNICAMP). Especialmente aos colegas doutorandos Adriana Salomão (IB-UNICAMP) e Thiago Inácio B. Lopes (IQ-UNICAMP).

Aos maravilhosos técnicos de laboratório que colaboraram imensamente na realização do trabalho: Aline Gambaro, Dra. Flavia Airoidi, Dona Maria, Fabiana Felix e Raphael Ricci. Além desses, agradeço também a toda a equipe de trabalho do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (RMN-IQ/UNICAMP) principalmente (Anderson, Soninha e a Paula) que sempre estavam prontos a colaborar com o trabalho.

Um agradecimento mais que especial a Simone Dias pelo carinho e atenção durante todos esses anos e a sua mãe, Dona Ângela, que em um dos

momentos mais difíceis do nosso trabalho, abriu as portas da sua casa para colaborar com a Ciência.

Ao pessoal da biblioteca do IQ, diretoria e oficinas, em especial a equipe da vidraria e da elétrica. Ao Pimpim (gases) e a equipe da zeladoria principalmente o Sr. Manoel e Sr. Nestor, pessoas que não mediam esforços para ajudar no que fosse preciso.

À equipe de trabalho da CPG-IQ em especial a Bel, Gaby e Miguel. Eles sempre nos atendem com carinho e atenção a todos os tramites burocráticos que envolvem a elaboração da tese entre outros. Aos colegas de outros grupos, Lilian & Clelton, Aline Guadalupe, Rose, Tarsila, Almas e Marcelo Freire pela agradável convivência.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa que com eles aprendi muito ao longo desses anos: Adriana Pianaro e Márcio, Bruna Zucoloto e Arnaldo, Carla Porto e Eduardo Pilau, Célio Angolini, Daniele Rocha, Diana Araújo, Felipe Wouters, Marília Medeiros, Muhammad Haleem, Lair Sabóia, Lucas Martins, Simone Mantovani e Thiago Inácio. Às pós-doutoras, Caroline Gonçalves e Dávila Zampieri por todos os ensinamentos.

À minha grande amiga Dra. Daniela Alves Ribeiro pelo apoio e acolhimento. Aos meus amigos de Montes Claros, Ciça e Marquin, Paty e Manin, Nanda e Adler, Paula e Laércio que sempre torceram por essa conquista. Aos amigos do grupo de oração ENFIR pelo apoio espiritual.

À Petrobrás pelo suporte financeiro. À Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Montes Claros (ICA-UFMG), que me concedeu o afastamento de maneira a permitir a minha qualificação. Gostaria de agradecer imensamente aos meus colegas da ICA-UFMG: Maria Clara Madureira, Helder de Castro, Maria Aparecida Santos e Janderson Tolentino, entre outros que junto comigo acreditaram que seria possível. Agradecer aos professores Ernane Martins e Delacyr Brandão pelo apoio para conquista dessa qualificação.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a minha formação profissional e pessoal, muito obrigada!

CURRICULUM VITAE RESUMIDO

Francine Souza Alves da Fonseca

francinefonseca@yahoo.com.br

1. FORMAÇÃO E TÍTULOS ACADÊMICOS

2009-2013: Doutorado em Ciências

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP.

Área de Concentração: Química Orgânica

Título da Tese: Ecologia Química de Percevejos da Família Phloeidae e Caracterização de Oxirredutases de *Bacillus safensis* Isolado do Petróleo

Orientadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli (Instituto de Química - UNICAMP)

2006-2008: Mestrado em Ciências Biológicas

Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), Montes Claros, MG.

Área de concentração: Ecologia

Título da Dissertação: Padrões de Ataque de Insetos Herbívoros em Frutos de *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. Ex. Martius (Arecaceae)

Orientador: Prof. Dr. Maurício Lopes de Faria

2005-2006: Especialização em Química

Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

Área de concentração: Química de alimentos

Título Monografia: Compostos fenólicos presentes na casca do Pequi (*Caryocar brasiliense camb.*).

Orientador: Profa. Dra. Angelita Duarte Corrêa

2000-2004: Licenciatura em Ciências Biológicas

Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), Montes Claros, MG.

1996-1998: Técnico em Química

Fundação Educacional de Montes Claros (FEMC), Montes Claros, MG.

2. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2.1 Programa de Estágio a Docência (IQ/Unicamp) – PED B

- Disciplina: QO 620 Química Orgânica Experimental (Química noturno).

Período: 1º Semestre 2010

2.2 Docente

- Faculdades Santo Agostinho. Disciplina: Farmacobotânica. Período: 2007 e 2008
- Faculdades Unidas Norte Minas. Disciplina: Biologia geral. Período: 2005 e 2006

2.3 Técnico de laboratório acadêmico e industrial

- Universidade Federal Minas Gerais. Período: 2005 a 2009
- Universidade Estadual de Minas Gerais. Período: 2003 a 2005
- Novo Nordisk. Período: 1999 a 2002

3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Patente

- Coletor de frutos e folhas, 2008. Depósito INPI MU8801104-6U2.

3.2 Artigos completos publicados

RIBEIRO, Roberto Ananias; FONSECA, Francine Souza Alves da; SILVA, Patrícia Nery. Aula prática como motivação para estudar química e o perfil dos estudantes do 3º ano do Ensino Médio da cidade de Montes Claros. UNIMONTES Científica, Montes Claros, v. 5, p. 155-159, 2004.

3.3 Trabalhos Resumidos em Eventos

- FONSECA, Francine Souza Alves da; Salomão, A.T; Vasconcellos-Neto, J.; Marsaioli, A.J. **Identification of chemical compounds in metathoracic glands of the bark bug**. BCNP, 2011.

- FONSECA, Francine Souza Alves da; Salomão, A.T; Vasconcellos-Neto, J.; Marsaioli, A.J. **Análise de voláteis emitidos por percevejos *Phloea subquadrata* e *Phloeophana longirostris* (Heteroptera: Phloeidae)**. VII Encontro Brasileiro de Ecologia Química, 2011.

- FONSECA, Francine Souza Alves da; Angolini, C. F. F.; Reis, F. A. M.; Souza, A. P.; Oliveira, V. M. de Santo Neto, E. V.; Marsaioli, A. J. **Isolation and Identification of Proteins Isolated from Petroleum Microorganism**. 4º Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas BrMASS, 2011.

- FONSECA, Francine Souza Alves da; Angolini, C.F.F.; Saraiva A. M.; Souza, A. P.; Reis, F. A. M.; Marsaioli, A.J. **Deteção e purificação de oxidoreductase de micro-organismo isolado do petróleo**. IV Encontro Regional de Biotatálise e Biotransformação, Montevideo, 2010.

RESUMO

Este trabalho de tese aborda aspectos da ecologia química de percevejos da família Phloeidae e a caracterização de oxirredutases do micro-organismo *Bacillus safensis*, em dois capítulos distintos:

Capítulo I. Este trabalho revelou aspectos inéditos da ecologia química de *Phloeophana longirostris* e *Phloea subquadrata*, duas espécies de percevejo da família Phloeidae. Esta família, representada por apenas três gêneros e quatro espécies, é caracterizada por apresentar cuidado maternal com ovos e ninfas e camuflagem sobre o tronco das árvores hospedeiras. O objetivo deste trabalho foi localizar, identificar e caracterizar os principais compostos voláteis emitidos por percevejos e verificar a relação destes com as árvores hospedeiras. Os resultados revelaram que os insetos, após estímulo físico, liberam aldeídos e hidrocarbonetos insaturados, oxoaldeídos e ésteres como compostos majoritários. Além disso, foi possível discriminar compostos característicos de cada grupo estudado. **Capítulo II.** Na segunda parte deste trabalho, foi explorada a atividade enzimática do micro-organismo *Bacillus safensis* isolado do petróleo brasileiro. Esse micro-organismo apresenta um arsenal enzimático capaz de degradar compostos orgânicos aromáticos. O objetivo deste trabalho foi purificar, isolar e identificar oxirredutases presentes na cepa (CFA06) de *Bacillus safensis*. Através dessa bactéria Gram-positiva, altamente resistente à radiação ultravioleta, foi possível identificar duas oxirredutases, sendo uma delas inédita. A oxirredutase inédita, aqui denominada de BsP315, apresenta 21 kDa e ferro e molibdênio ligados a essa proteína. Além dessa oxirredutase, uma catalase, aqui denominada de BsCat, também foi identificada.

ABSTRACT

This thesis investigates the chemical ecology aspects of the Phloeidae stink bugs and the characterization of the *Bacillus safensis*'s oxidoreductases in two separate chapters:

Chapter I. This study revealed novel aspects of the chemical ecology of *Phloeophana longirostris* and *Phloea subquadrata* from Phloeidae family. This family, has only three genders and four species with characteristic maternal care of eggs and nymphs and camouflage on the trunk of the host tree. The aim of this study was to the identification of major volatile compounds produced by the stink bugs and their relationship with the host trees. The results revealed that after physical stimulation, the insects release aldehydes and unsaturated hydrocarbons, esters and oxoaldehyde as major compounds. These volatile compounds were important in the discrimination of male, female and nymphs of each species.

Chapter II. In the second part of this research, we investigated the enzymatic activity of the micro-organism *Bacillus safensis* isolated from Brazilian oil. This micro-organism has an enzymatic arsenal capable of degrading aromatic organic compounds. The aim of this study was to purify, isolate and identify oxidoreductases present in strain (CFA06) *Bacillus safensis*. Through this Gram-positive bacterium, highly resistant to ultraviolet radiation, it was possible to identify two oxidoreductases. The novel oxidoreductase, here named BsP315 has 21 kDa and iron and molybdenum bound to its catalytic site, additionally we have isolated a catalase here named BsCat.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS	xxiii
LISTA DE ESQUEMAS	xxv
LISTA DE FIGURAS	xxvii
LISTA DE TABELAS	xxxv
LISTA DE ANEXOS	xxxvii
CAPÍTULO I.	1
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. Aspectos da Biologia de Percevejos.....	4
1.2. Família Phloeidae	5
2. OBJETIVOS.....	9
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
3.1. Composição Química do Extrato Total de <i>Phloea subquadrata</i>	11
3.1.1. Quantificação dos compostos presentes no extrato total.....	13
3.2. Composições Químicas dos Voláteis.....	15
3.2.1. <i>Headspace</i> dinâmico dos voláteis de <i>Phloea subquadrata</i>	15
3.2.2. <i>Headspace</i> estático (SPME) dos voláteis de <i>Phloea subquadrata</i>	18
3.2.3. <i>Headspace</i> estático (SPME) dos voláteis de <i>Phloeophana longirostris</i>	29
3.2.4. Voláteis de <i>Phloea subquadrata</i> versus <i>Phloeophana longirostris</i>	40
3.3. Identificação e Caracterização dos Compostos do Conteúdo das Glândulas	45
3.3.1. Identificação do conteúdo das glândulas	46
3.3.2. Caracterização química do conteúdo glandular	49
3.4. Análises dos Voláteis das Plantas	53
3.5. Sínteses de Padrões.....	56
4. CONCLUSÕES.....	61

CAPÍTULO II.	63
5. INTRODUÇÃO.....	65
5.1. Micro-organismos do Gênero <i>Bacillus</i>	65
5.2. <i>Bacillus safensis</i>	66
5.3. Oxirredutases	67
6. OBJETIVOS.....	71
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
7.1. Detecção da Atividade Enzimática de <i>Bacillus safensis</i>	73
7.2. Purificação das Oxirredutases de <i>Bacillus safensis</i>	77
7.3. Monitoramento das Atividades de Oxirredutases nas Frações Purificadas de <i>Bacillus safensis</i>	79
7.3.1. Teste com substrato fluorogênico	79
7.3.2. Teste de detecção do grupo heme	80
7.3.3. Análise qualitativa da presença de metais	83
7.3.4. Teste qualitativo para catalase	83
7.4. Identificação da BsP315 de <i>Bacillus safensis</i>	85
7.4.1. Massa exata da BsP315 por ESI(+)-QTOF/MS	85
7.4.2. Estrutura primária da BsP315.....	86
7.5. Identificação e Estrutura Primária da BsCat	88
8. CONCLUSÕES.....	91
PARTE EXPERIMENTAL.....	93
9.1. Métodos Gerais	95
9.1.2. Solventes e reagentes	95
9.1.3. Métodos cromatográficos e de espectrometria de massas	95
9.1.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	95
9.1.3.2. Cromatografia em coluna (CC)	96

9.1.3.3. Cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC)	96
9.1.3.4. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	96
9.1.3.5. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa	98
9.1.3.5.1. LTQ-Orbitrap.....	98
9.1.3.5.2. ESI-QTOF	98
9.1.4. ICP-MS	99
9.1.5. Cálculo dos índices de retenção	99
9.1.6. Espectroscopia de RMN	100
9.1.7 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho e UV-Visível.....	101
9.1.8 Lupa estereoscópica.....	101
9.1.9 Microscopia eletrônica de varredura.....	101
9.2. Métodos Específicos–Capítulo I	102
9.2.1. Coleta de material.....	102
9.2.2. Preparo do extrato total dos insetos	102
9.2.2.1. Quantificação dos compostos do extrato total de <i>Phloea subquadrata</i>	103
9.2.3. Análise dos compostos voláteis	103
9.2.3.1. <i>Headspace</i> dinâmico	103
9.2.3.2. Microextração em fase sólida (SPME).....	104
9.2.4. Análises do conteúdo das glândulas metatorácicas e abdominais	106
9.2.5. Voláteis das plantas.....	107
9.2.6. Procedimentos sintéticos	107
9.2.6.1. Síntese do (<i>E</i>)-2-hexenol	107
9.2.6.2. Síntese do (<i>E</i>)-4-oxo-2-hexenal	108
9.2.6.3. Confirmação estrutural do (<i>E</i>)-4-oxo-2-hexenal por co-injeção	109

9.2.7.1. Pré-processamento.....	110
9.3.1. Procedimentos gerais adotados no laboratório de biocatálise	111
9.3.2. Micro-organismo <i>Bacillus safensis</i>	111
9.3.3. Preparo do meio de cultivo	111
9.3.4. Coloração de Gram.....	112
9.3.5. Ensaio de triagem para detecção de monoxigenases.....	112
9.3.5.1. Solução tampão borato (ácido Bórico-bórax).....	113
9.3.5.2. Preparo das soluções de substratos fluorogênicos	114
9.3.5.3. Solução de albumina de soro bovino (BSA)	115
9.3.5.4. Solução de NADPH	115
9.3.5.5. Solução de NADH.....	115
9.3.5.6. Solução de NAD	115
9.3.6. Preparo do extrato solúvel	115
9.3.7. Purificação das proteínas	116
9.3.7.1. Troca catiônica	116
9.3.7.2. Troca aniônica	117
9.3.7.3. Tampão Tris-HCl (50 mmol·L ⁻¹ ; pH 7,6).....	117
9.3.7.4. Tampão fosfato de sódio (50 mmol·L ⁻¹ ; pH 7,6).....	117
9.3.8. Triagem das frações do extrato proteico purificado	118
9.3.9. Verificação da presença do grupo heme	119
9.3.10. Teste qualitativo para catalase	119
9.3.11. Eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-PAGE)	119
9.3.11.1. Preparo do gel separador	120
9.3.11.2. Preparo do gel concentrador	120
9.3.11.3. Adição do gel concentrador ao sistema	121

9.3.11.4. Adição das amostras no gel.....	121
9.3.12. Preparo das amostras para análises de espectrometria de massas ...	121
9.3.12.1. Descoloração do gel	122
9.3.12.2. Redução e alquilação	122
9.3.12.3. Tripsinização.....	122
9.3.12.4. Extração dos peptídeos	123
9.3.12.5. Solução descolorante (100 mmol·L ⁻¹)	123
9.3.12.6. Solução de DTT	123
9.3.12.7. Solução de iodoacetamida.....	124
ANEXOS	125

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
BSA	Albumina do soro bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de massas
CID	Dissociação induzida por colisão (<i>collision induced dissociation</i>)
CP	Componente principal
COSY	Correlação homonuclear de ^1H , ^1H a múltiplas ligações (<i>correlation spectroscopy</i>)
D	Dupleto
Da	Dalton
DTT	Ditiotreitol
Dd	Duplo dubleto
DEPT	Incrementosem distorção por transferência de polarização (<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EI	Impacto de elétrons
ESI	Ionização por eletrospray (<i>electrospray ionization</i>)
eV	Elétron volt
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FPLC	Cromatografia líquida rápida de proteínas (<i>fast protein liquide chromatography</i>)
FR	Fator resposta
HSQC	Correlação heteronuclear de ^1H ^{13}C a uma ligação (<i>hetero single quantum coherence</i>)
Hz	Hertz
ICP-MS	Espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (<i>inductively couple plasma mass spectrometry</i>)
IRMS	Razão isotópica por espectrometria de massas (<i>isotope-ratio mass spectrometry</i>)
IV	Infravermelho

J	Constante de acoplamento
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>)
M	Multiplete
MS/MS	Experimentos de espectrometria de massas em sequência
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
NAD	Nicotinamida adeninad nucleotídeo oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP	Nicotinamida adeninad nucleotídeo fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adeninad nucleotídeo fosfato reduzido
NMR	Ressonância magnética nuclear (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
PDB	Banco de dados de proteínas (<i>protein data bank</i>)
PI	Ponto isoelétrico
PLS-DA	Análise discriminatória por quadrados mínimos parciais (<i>partial least squares discriminant analysis</i>)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (<i>phenylmethane sulfonyl fluoride</i>)
Q	Quadrupolo
R _f	Fator de retenção
R	Coeficiente de correlação
RPM	Rotação por minuto
S	Simpleto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (<i>sodium dodecyl-sulphate polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (<i>solid phase micro extraction</i>)
T	Triplete
TEMED	N,N',N N' - tetrametilenodiamina
THF	Tetraidrofurano
Tris	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TMS	Tetrametilsilano
TOF	Tempo de voo, do inglês <i>time of flight</i>

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Proposta de reação para formação do produto (<i>E</i>)-4-oxo-2-hexenal (19).....	56
Esquema 2. Substrato 122, com os possíveis produtos 123 e 131 após oxidação enzimática, levando a posterior formação do ânion umbeliferila (130).....	75
Esquema 3. Substrato 126, com o produto 127 após oxidação enzimática levando a posterior formação do ânion umbeliferila (130).	75
Esquema 4. Ciclo catalítico da Baeyer-Villiger monooxigenase.....	76
Esquema 5. Proposta de mecanismo da hidroxilação de substratos através da P450.....	82
Esquema 6. Ciclo catalítico das peroxidases com grupo heme.....	85
Esquema 7. Esquema de análise para identificação dos compostos presentes no extrato corpóreo de <i>Phloea subquadrata</i>	102
Esquema 8. Modelo de funcionamento do <i>headspace</i> dinâmico utilizando a resina Porapak-Q®	104
Esquema 9. Sequência de análise para coleta dos voláteis por SPME.	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura da antena de macho de <i>Phloea subquadrata</i> , apresentação os três segmentos: escapo (A), pedicelo (B) e flagelo (C). (Foto: Francine Souza Alves Fonseca).	5
Figura 2. Indivíduos de <i>Phloea subquadrata</i> . A: fêmea. B: par de antenas do macho. C: região dorsal da cabeça do macho (Fotos: Francine Fonseca).	7
Figura 3. Indivíduos de <i>Phloeophana longirostris</i> em seu habitat natural A: Ninfa de 4° ínstar sobre planta hospedeira. B: Fêmea camuflada sobre a casca da árvore. (Fotos: Francine Fonseca).	7
Figura 4. Cromatogramas de íons totais (CG-EM) dos compostos presentes no extrato total dos insetos analisados. Condição de análise: 40°C (3min), seguida de 10°C/min até 290°C.....	12
Figura 5. Compostos detectados nos extratos totais de indivíduos de <i>Phloea subquadrata</i>	13
Figura 6. Cromatograma de íons totais (CG-EM) dos voláteis utilizando Porapak-Q®, e seus produtos de decomposição. Condições de análise: 40 °C (3 min), seguida de 10 °C·min ⁻¹ até 290 °C. Numeração dos picos no cromatograma conforme a Figura 7.	16
Figura 7. Compostos detectados por CG-EM provenientes da decomposição do Porapak-Q®.	16
Figura 8. Ampliação dos cromatogramas de íons totais (CG-EM) da Figura 6 da região de compostos voláteis exclusivos das fêmeas. Em azul a análise controle (branco) e em preto, análise da fêmea de <i>Phloea subquadrata</i> . Numeração dos picos conforme Anexo 6 e Tabela 3.	17
Figura 9. Ampliação do cromatograma de íons totais (CG-EM), referente à região dos voláteis da ninfa de 5° ínstar. Condições de análise: 40 °C (3 min), seguida de 10 °C·min ⁻¹ até 290 °C. Numeração dos picos no Anexo 6. Cromatograma completo Anexo 4.....	18
Figura 10. Principais compostos voláteis detectados nos indivíduos de <i>Phloea subquadrata</i>	19

Figura 11. Cromatogramas de íons totais (CG-EM/SPME) dos voláteis de fêmea de <i>Phloea subquadrata</i> em repouso e após condição de estímulos. Condições de análise: 40°C (3 min), seguida de 10°C·min ⁻¹ até 290°C. Numeração sobre os picos correspondem Tabela 3.	20
Figura 12. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (4 CP; 58,67% da informação presente nos dados originais; R _{val} = 0,95; R _{cal} = 0,99), mostrando a discriminação dos indivíduos jovens e adultos da espécie <i>Phloea subquadrata</i> ...	21
Figura 13. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 12, destacando os compostos relevantes na distinção de indivíduos jovens e adultos da espécie <i>Phloea subquadrata</i>	21
Figura 14. Cromatogramas de íons totais (CG-EM/SPME) dos voláteis dos jovens (2° ao 5° ínstaes) <i>Phloea subquadrata</i> , após estímulo. Condições de análise: 40°C (3 min), seguida de 10 °C·min ⁻¹ até 290°C. Numeração sobre os picos correspondem aos compostos Tabela 3.	22
Figura 15. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (3 CP; 77,37% da informação presente nos dados originais; R _{val} = 0,95; R _{cal} = 0,99), mostrando a discriminação dos indivíduos jovens da espécie <i>Phloea subquadrata</i> nos respectivos ínstaes ao longo da bissetriz dos quadrantes pares.	23
Figura 16. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 15, destacando os compostos relevantes na distinção dos ínstaes de <i>Phloea subquadrata</i>	24
Figura 17. Cromatogramas de íons totais (CG-EM/SPME) dos voláteis de macho e fêmea de <i>Phloea subquadrata</i> . Condição de análises: 40°C (3min), 10°C·min ⁻¹ até 290°C. Numeração sobre os picos correspondem aos compostos da Tabela 3.	25
Figura 18. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (6 CP; 81,24% da informação presente nos dados originais; R _{val} = 0,89; R _{cal} = 0,99), mostrando a discriminação dos indivíduos machos e fêmeas da espécie <i>Phloea subquadrata</i> ao longo de CP1.....	25
Figura 19. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 18, destacando os compostos relevantes na distinção dos indivíduos adultos <i>Phloea subquadrata</i> . .	26

Figura 20. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (5 CP; 71,46% da variância; $R_{val} = 0,96$; $R_{cal} = 0,99$) mostrando a discriminação dos indivíduos jovens e adultos da espécie <i>Phloeophana longirostris</i> ao longo de CP1.	30
Figura 21. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 20, destacando os compostos relevantes na distinção dos indivíduos jovens e adultos da espécie <i>Phloeophana longirostris</i> (PI).	30
Figura 22. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (4 CP; 85,44% da variância; $R_{val} = 0,96$; $R_{cal} = 0,99$), mostrando a discriminação dos indivíduos jovens da espécie <i>Phloeophana longirostris</i> segundo os respectivos ínstares ao longo de CP1.....	31
Figura 23. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 22, destacando os compostos relevantes na distinção dos indivíduos jovens de <i>Phloeophana longirostris</i>	31
Figura 24. Cromatogramas de íons totais (CG-EM/SPME) dos voláteis de indivíduos jovens (2° ao 4° ínstares) de <i>Phloeophana longirostris</i> após estímulo. Numeração sobre os picos correspondem aos compostos da Tabela 4.	32
Figura 25. Cromatogramas de íons totais (CG-EM/SPME) dos voláteis de macho e fêmea de <i>Phloeophana longirostris</i> . Condição das análises: 40 °C (3 min), 10°C·min ⁻¹ até 290°C. Numeração sobre os picos correspondem aos compostos da Tabela 4.	33
Figura 26. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (2 CP; 59,44% da variância; $R_{val} = 0,66$; $R_{cal} = 0,94$) mostrando a discriminação entre machos e fêmeas da espécie <i>Phloeophana longirostris</i> ao longo de CP1.	33
Figura 27. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 26, destacando os compostos relevantes na distinção dos indivíduos machos e fêmeas pertencentes à espécie <i>Phloeophana longirostris</i> (PI).	34
Figura 28. Feromônios sexuais de algumas espécies de percevejos.....	35
Figura 29. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (4 CP; 48,04% da variância; $R_{val} = 0,89$; $R_{cal} = 0,96$) mostrando a discriminação entre indivíduos pertencentes às espécies <i>Phloea subquadrata</i> (Ps) e <i>Phloeophana longirostris</i> (PI) ao longo de CP1.....	41

Figura 30. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 29, destacando os compostos relevantes na distinção dos indivíduos da espécie <i>Phloeophana longirostris</i> (PI) e <i>Phloea subquadrata</i> (Ps).....	42
Figura 31. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (4 CP; 47,23% da variância; $R_{val} = 0,95$; $R_{cal} = 0,98$) mostrando a discriminação entre indivíduos jovens e adultos pertencentes às espécies <i>Phloea subquadrata</i> (Ps) e <i>Phloeophana longirostris</i> (PI) ao longo de CP1 e PC2.....	43
Figura 32. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 31 destacando os compostos relevantes na distinção dos indivíduos jovens e adultos da espécie <i>Phloeophana longirostris</i> (PI) e <i>Phloea subquadrata</i> (Ps).....	43
Figura 33. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (5 CP; 66,74% da variância; $R_{val} = 0,75$; $R_{cal} = 0,99$) mostrando a discriminação entre machos e fêmeas pertencentes às espécies <i>Phloea subquadrata</i> (Ps) e <i>Phloeophana longirostris</i> (PI) ao longo de CP1.....	44
Figura 34. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 33 destacando os compostos relevantes na distinção entre machos e fêmeas das espécies <i>Phloeophana longirostris</i> (PI) e <i>Phloea subquadrata</i> (Ps).....	45
Figura 35. Cromatograma de íons totais (CG-EM) do conteúdo glandular de macho <i>Phloea subquadrata</i> na ausência de solventes. Condição de análise: 40 °C (3 min)-290 °C (10 °C·min ⁻¹). (*) solvente. D: composto desconhecido. Numeração dos picos cromatográficos conforme Figura 40.....	46
Figura 36. Cromatograma de íons totais obtidos através da análise (CG-EM) do conteúdo glandular de macho <i>Phloea subquadrata</i> diluído em acetato de etila. Condições de análise: 40 °C-290 °C (10 °C·min ⁻¹). Numeração dos picos cromatográficos conforme Figura 40.....	47
Figura 37. Exúvias de 4º ínstar da espécie <i>Phloea subquadrata</i> . (Foto: Francine S.A. Fonseca).....	47
Figura 38. Cromatograma de íons totais (CG-EM) de exúvias de 4º ínstar de <i>Phloea subquadrata</i> . Condições de análise: 40°C (3 min)-290°C (10 °C·min ⁻¹). Numeração dos picos cromatográficos conforme Figura 40. (*) produtos de decomposição da coluna cromatográfica.	48

Figura 39. Cromatograma de íons totais (CG-EM) de exúvias de <i>Phloea subquadrata</i> . Condições de análise: 40°C (3 min)-290°C (10 °C·min ⁻¹). Numeração dos picos cromatográficos conforme Figura 40. (*) contaminantes do solvente....	48
Figura 40. Compostos majoritários presentes nas glândulas de <i>Phloea subquadrata</i> e <i>Phloeophana longirostris</i>	49
Figura 41. Espectro de RMN de ¹ H (400,00 MHz, CDCl ₃ , TMS) da misturas dos compostos (undecano, (<i>E</i>)-2-hexenal, (<i>E</i>)-4-oxo-2-hexenal), retirados diretamente da glândula de macho de <i>Phloea subquadrata</i>	49
Figura 42. Espectro de RMN de ¹³ C (125,69 MHz, CDCl ₃) da secreção da glândula de macho de <i>Phloea subquadrata</i> . Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	50
Figura 43. Caules de espécies de Myrtaceae hospedeiras de <i>Phloea subquadrata</i> na Serra do Japi, Jundiaí, SP. A: <i>Myrciaria floribunda</i> var. “vermelha”; B: <i>M. floribunda</i> var. “branca”; C: <i>Eugenia blastantha</i> ; D: <i>Eugenia</i> sp.; E: <i>E. acutata</i> .; F: <i>E. neoverrucosa</i> .(Fotos: Adriana T. Salomão)	53
Figura 44. Cromatograma de íons totais (CG-EM/SPME) referente à análise dos voláteis das plantas através da técnica de SPME. A: planta hospedeira (<i>Eugênicia acutata</i>). B: planta não hospedeira (<i>Ciclolobium</i> sp.). Condição de análise: 40 °C (3 min), seguida de 10 °C·min ⁻¹ até 290 °C.....	54
Figura 45. Compostos voláteis detectados nas plantas analisadas.	55
Figura 46. Cromatogramas de íons totais (CG-EM) referentes à co-injeção do produto sintético (<i>E</i>)-4-oxo-2-hexenal com o conteúdo glandular de fêmea de <i>Phloea subquadrata</i> . Condições de análise: 40 °C (3 min), seguida de 10 °C·min ⁻¹ até 290 °C. Numeração dos picos conforme Anexo 6.....	57
Figura 47. Cromatograma de íons totais (CG-EM) dos produtos sintéticos referentes aos dímeros do 4-oxo-2-hexenal (D, E, F e G). Condição de análise: 40°C (3 min), seguida de 10 °C·min ⁻¹ até 290°C. Tempo de retenção D: 20,75 minutos; E: 20,94 minutos; F: 21,09 minutos; G: 21,16 minutos.	58
Figura 48. Cromatograma de íons totais (CG-EM) do conteúdo glandular de macho <i>Phloea subquadrata</i> (na ausência de solventes), mostrando os 4 dímeros	

naturais (m/z 224).Condições de análise: 40°C (3 min)-290 °C (10 °C·min ⁻¹). Numeração dos picos cromatográficos conforme Tabela 3.	58
Figura 49. Substratos fluorogênicos e respectivos produtos de oxidação utilizados nos ensaios com <i>Bacillus safensis</i> (CFA06).....	73
Figura 50. Classificação da P450 conforme o sistema de transferência de elétrons.	77
Figura 51. Gel SDS-PAGE contendo, no primeiro canal do pente o marcador de peso molecular (<i>Broad Range Protein Ladder</i>), seguido do extrato solúvel, (3 e 5) <i>flow through</i> e das frações coletadas (3 a 17; gel A) e (19 a 40; gel B).....	79
Figura 52. Espectro no ultra-violeta (UV) mostrando a absorção máxima da fração que contém a enzima responsável pela oxidação na presença de monóxido de carbono e ditionito de sódio.....	81
Figura 53. Resultado do teste qualitativo indicando a presença da enzima catalase. A: Placa com o <i>Bacillus safensis</i> placa controle. B: frações obtidas da purificação do extrato proteico.	84
Figura 54. Espectro de massas (deconvoluido) da fração 10 que contém a proteína de interesse (ACN:H ₂ O (1:1), 0,1% HCOOH).	86
Figura 55. Análise realizada no programa <i>Proteomic Discover</i> , revelando, em verde, a cobertura dos peptídeos identificados com o banco de dados do <i>Bacillus pumilus</i> do NCBI. Legenda com a nomenclatura dos aminoácidos (Anexo 156)..	87
Figura 56. Sequência de aminoácidos, com mutações, obtidas a partir da análise de sequenciamento “De Novo” utilizando o programa <i>Peaks 6.0</i> . Legenda com a nomenclatura dos aminoácidos (Anexo 156).	88
Figura 57. Análise realizada na plataforma do <i>Proteomic Discover</i> , através do programa <i>Sequest</i> , revelando uma catalase de <i>Bacillus safensis</i> . Em verde, a cobertura e os peptídeos identificados com o banco de dados NCBI (<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032). Legenda com a nomenclatura dos aminoácidos (Anexo 156).	89
Figura 58. A: Glândula metatorácica do macho de <i>Phloea subquadrata</i> e retirada do conteúdo com auxílio de uma microseringa.	106
Figura 59. Substratos fluorogênicos e seus respectivos controles.	114

Figura 60. A: equipamento FPLC. B: frações coletas após a purificação. C: colunas de troca aniônica e troca catiônica.....	116
Figura 61. A- Cuba de eletroforese montada. B- Corrida em andamento. C- Sistema de foto-documentação.....	120
Figura 62. Transferência do gel separador para o aparato de eletroforese previamente montado.....	120
Figura 63. Adição do gel concentrador ao sistema contendo o gel separador ...	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Figuras de mérito para os compostos de interesse.....	14
Tabela 2. Quantificação dos compostos majoritários (em mg/g de inseto) de <i>Phloea subquadrata</i>	15
Tabela 3. Abundância relativa (%) referente à média e desvio padrão da composição química dos voláteis de <i>Phloea subquadrata</i>	27
Tabela 4. Abundância relativa (%) referente à média e desvio padrão da composição química dos voláteis de <i>Phloeophana longirostris</i>	36
Tabela 5. Resumo dos modelos de PLS-DA.....	40
Tabela 6. Atribuições dos deslocamentos químicos de RMN dos compostos (<i>E</i>)-2-hexenal (10) e (<i>E</i>)-4-oxo-2-hexenal (19) retirados da glândula de macho <i>Phloea subquadrata</i>	51
Tabela 7. Resultados obtidos (%) com <i>Bacillus safensis</i> cepa CFA06 nos ensaios com substratos (122-128) para detecção de oxigenases	74
Tabela 8. Condições de funcionamento de Elan DRC-ICP e MS	99
Tabela 9. Parâmetros referentes as análises dos voláteis por CG-EM/SPME....	105
Tabela 10. Solução Tampão ácido bórico-bórax.....	113

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Resumo dos modelos PLS-DA.....	127
Anexo 2. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (3 CP; 37,84% da variância; $R_{val} = 0,57$; $R_{cal} = 0,89$), mostrando a discriminação entre indivíduos jovens pertencentes às espécies <i>Phloea subquadrata</i> (PS) e <i>Phloeophana longirostris</i> (PL) ao longo de CP1 e PC2.....	128
Anexo 3. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA do Anexo 2, destacando os compostos relevantes na distinção dos indivíduos jovens pertencentes às espécies <i>Phloeophana longirostris</i> (Pl) e <i>Phloea subquadrata</i> (Ps).....	128
Anexo 4. Cromatograma de íons totais (CG-EM) referente à análise dos voláteis da ninfa de 5º instar <i>Phloea subquadrata</i> utilizando Porapak-Q®. Condições de análise: 40 °C (3 min), seguida de 10 °C·min ⁻¹ até 290 °C. Numeração dos picos no cromatograma (de 115 a 121, conforme Figura 7) e (19, 32 e 37, conforme Anexo 6).....	129
Anexo 5. Cromatograma de íons totais (CG-EM) referente à análise dos voláteis do macho de <i>Phloea subquadrata</i> utilizando Porapak-Q®. Condições de análise: 40 °C (3 min), seguida de 10 °C·min ⁻¹ até 290 °C. Numeração dos picos no cromatograma (de 115 a 121, conforme Figura 7).....	129
Anexo 6. Compostos voláteis da espécie <i>Phloea subquadrata</i> e <i>Phloeophana longirostris</i> analisados por CG-EM adsorvidos (SPME-Carboxen PDMS).	130
Anexo 7. Espectro de massas (CG-EM/SPME) da 1-penten-3-ona (1).....	146
Anexo 8. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 2-etilfurano (2)...	146
Anexo 9. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2-vinilfurano (3).....	146
Anexo 10. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2-metil-2-butenal (4).	146
Anexo 11. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (<i>E</i>)-2-pentenal (5).	147
Anexo 12. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2-metil-butanoato de metila(6).	147
Anexo 13. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 2-metil-3-pentenal (7).....	147

Anexo 14. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto (<i>E</i>)-3-hexenal (8).	147
Anexo 15. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto (<i>Z</i>)-2-hexenal (9).	148
Anexo 16. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (<i>E</i>)-2-hexenal (10).....	148
Anexo 17. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 5-metil-2(3H)- furanona (11).....	148
Anexo 18. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (<i>E</i>)-2-hexen-1-ol (12).	148
Anexo 19. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 13.	149
Anexo 20. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2,4-hexadienal (15).....	149
Anexo 21. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do acetato-3-metil-2-butenila (16).	149
Anexo 22. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do hexanoato de metila (17)..	149
Anexo 23. Espectro de massas (CG-EM/SPME) da 3-hepten-2-ona (18).....	150
Anexo 24. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (<i>E</i>)-4-oxo-2-hexenal (19)...	150
Anexo 25. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 3-metilexanoato de metila (20).....	150
Anexo 26. Espectro de massas (CG-EM/SPME) da 5-etil-2(3H)-furanona (22).	150
Anexo 27. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 23.	151
Anexo 28. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do acetato de (<i>Z</i>)-3-hexenila (25).	151
Anexo 29. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto acetato de (<i>Z</i>)-2- hexenila (26).....	151
Anexo 30. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do acetato de hexila (27).	151
Anexo 31. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do acetato de (<i>E</i>)-2-hexenila (28).	152
Anexo 32. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 29.	152
Anexo 33. Espectro de massas (CG-EM/SPME) da 5-etil-2(5H)-furanona (30).	152
Anexo 34. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (<i>Z</i>)-2-octenal (31).....	152
Anexo 35. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (<i>E</i>)-2-octenal (32).....	153
Anexo 36. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 33.	153

Anexo 37. Espectro de massas (CG-EM/SPME) da 2-cicloexene-1,4-diona(35).	153
Anexo 38. Espectro de massas (CG-EM/SPME) da 2-isopropilcicloexanona (38).	153
Anexo 39. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (<i>E</i>)-2-nonenal (39).	154
Anexo 40. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2-propilcicloexanona (40)..	154
Anexo 41. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do butanoato de 2-hexenila (41).	154
Anexo 42. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (<i>E</i>)-2-acetato de 2-octenila (43).....	154
Anexo 43. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (<i>Z</i>)-2-decenal (44).....	155
Anexo 44. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2,4-decadienal (45).....	155
Anexo 45. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (<i>E</i>) 2-decenal(46).....	155
Anexo 46. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto β -humuleno (53).	155
Anexo 47. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do α -cariofileno (54).....	156
Anexo 48. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do acetato de 2-metilpropano (57).....	156
Anexo 49. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 3-metil 2-butenal (58).....	156
Anexo 50. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do isômero furanona (59).	156
Anexo 51. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do isômero do hexenol (60). ..	157
Anexo 52. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do acetato de 2-metilbutenila (61).....	157
Anexo 53. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto62.	157
Anexo 54. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 3-etil-2,4-pentadien-1-ol (63).	157
Anexo 55. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2-etil-2-pentenal (64).	158
Anexo 56. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2-propenoato de pentila (65).	158
Anexo 57. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do butanoato de 2-metilpropila (66).....	158

Anexo 58. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do benzaldeído (68).....	158
Anexo 59. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do isômero do furano (69).....	159
Anexo 60. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 3-metil-1-etilciclopentano (70).	159
Anexo 61. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do β -pineno (71).	159
Anexo 62. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do butanoato de butila (72)....	159
Anexo 63. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 73.	160
Anexo 64. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do isômero do decano (74)....	160
Anexo 65. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2-metil-5-(2-metil-2-propenila)- cicloexanol (75).	160
Anexo 66. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do limoneno (76).....	160
Anexo 67. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 5-metil-4-hexen-3-ona (77).	161
Anexo 68. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 3-oxiranil-7- oxabicyclo(4.1.0)heptano (78).....	161
Anexo 69. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 79.	161
Anexo 70. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do éster metílico do ácido benzóico (80).....	161
Anexo 71. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do aldeído “lilalic” (81).	162
Anexo 72. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do fenilacetato de metila (82). 162	
Anexo 73. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 83.	162
Anexo 74. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do α -copaeno (84).	162
Anexo 75. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 85.	163
Anexo 76. Espectro de massas(CG-EM/SPME) do β - elemeno (86).	163
Anexo 77. Espectro de massas (CG-EM/SPME)do α -gurjuneno (87).	163
Anexo 78. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do epi-biciclosesquifelandreno (88).....	163
Anexo 79. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do β -gurjuneno (89).	164
Anexo 80. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do β -aromadendreno (90).....	164
Anexo 81. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do α -aromadendreno (91).....	164
Anexo 82. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 92.	164

Anexo 83. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do δ -selineno (93).....	165
Anexo 84. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do β -selineno (94).....	165
Anexo 85. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do α -selineno (95).....	165
Anexo 86. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do β -cadineno (96).....	165
Anexo 87. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do β -germacreno (97).....	166
Anexo 88. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do epóxido de isoaromadendreno (98).....	166
Anexo 89. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do óxido de cedreno (99).....	166
Anexo 90. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do epóxido de humuleno II (100).	166
Anexo 91. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do óxido de bisaboleno (101).	167
Anexo 92. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do óxido humuleno III (102)...	167
Anexo 93. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do epóxido de alloaromadendreno (103).....	167
Anexo 94. Espectros de massas obtidos por (CG-EM) dos compostos desconhecidos (A, B e C) detectados nas análises de exúvias de 4º ínstar de <i>Phloea subquadrata</i>	168
Anexo 95. Espectro de RMN de ^1H (400,18 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula Macho de <i>Phloea subquadrata</i> : Expansão A. Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	169
Anexo 96. Espectro de RMN de ^1H (400,18 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula macho de <i>Phloea subquadrata</i> :Expansão B. Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	169
Anexo 97. Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula macho de <i>Phloea subquadrata</i> . Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	170
Anexo 98. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (125,69 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula macho de <i>Phloea subquadrata</i> . Espectro processado no programa <i>TopSpin</i> da Bruker.	170

Anexo 99. Mapa de contorno de RMN de 2D ^1H - ^{13}C - HSQC(400,18 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula macho de <i>Phloea subquadrata</i> . Espectro processado no programa <i>TopSpin</i> da Bruker.	171
Anexo 100. Mapa de contorno de RMN de 2D ^1H - ^1H - COSY(400,18 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula Macho de <i>Phloea subquadrata</i> . Espectro processado no programa <i>TopSpin</i> da Bruker.	171
Anexo 101. Espectro de RMN de ^1H (400,18 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula fêmea de <i>Phloea subquadrata</i> : Expansão A. Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	172
Anexo 102. Espectro de RMN de ^1H (400,18 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula fêmea de <i>Phloea subquadrata</i> : Expansão B. Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	172
Anexo 103. Espectro de RMN de ^{13}C (100,63 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula fêmea de <i>Phloea subquadrata</i> . Espectro processado no programa <i>TopSpin</i> da Bruker.	173
Anexo 104. Mapa de contorno de RMN de 2D ^1H - ^1H - COSY(400,18 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula fêmea de <i>Phloea subquadrata</i> . Espectro processado no programa <i>TopSpin</i> da Bruker.	173
Anexo 105. Mapa de contorno de RMN de 2D ^1H - ^{13}C - HSQC(400,18 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula fêmea de <i>Phloea subquadrata</i> . Espectro processado no programa <i>TopSpin</i> da Bruker.	174
Anexo 106. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula ninfa de 4° instar <i>Phloea subquadrata</i> . Espectro processado no programa <i>TopSpin</i> da Bruker.	174
Anexo 107. Espectro de RMN de ^1H (400,18 MHz, C_6D_6) do extrato total de ninfas 4° instar de <i>Phloeophana longirostris</i> . Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	175
Anexo 108. Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, C_6D_6) do extrato total de ninfas 4° instar de <i>Phloeophana longirostris</i> . Espectro processado no programa <i>TopSpin</i> da Bruker.	175

Anexo 109. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90. (100,63 MHz, C_6D_6) do extrato total de ninfas de 4° instar de <i>Phloeophana longirostris</i> . Espectro processado no programa <i>TopSpin</i> da Bruker.....	176
Anexo 110. Mapa de contorno de RMN de 2D ^1H - ^{13}C - HSQC(400,18 MHz, C_6D_6) do extrato total de ninfas de 4° instar de <i>Phloeophana longirostris</i> Espectro processado no programa <i>TopSpin</i> da Bruker.....	176
Anexo 111. Espectro de RMN de ^1H (250,13 MHz, C_6D_6) do padrão sintético (<i>E</i>)-2-hexenal (10). Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	177
Anexo 112. Espectro de RMN de ^{13}C (62,90 MHz, C_6D_6) do padrão sintético de (<i>E</i>)-2-hexenal (10). Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	177
Anexo 113. Espectro de RMN de ^1H (250,13 MHz, CDCl_3) do padrão sintético (<i>E</i>)-2-hexenal (10). Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	178
Anexo 114. Espectro de RMN de ^{13}C (62,90 MHz, CDCl_3) do padrão sintético do (<i>E</i>)-2-hexenal (10). Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	178
Anexo 115. Espectro de RMN de ^1H (250,13 MHz; C_6D_6) do padrão sintético de (<i>E</i>)-2-octenal (32). Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	179
Anexo 116. Espectro de RMN de ^{13}C (62,90 MHz, C_6D_6) do padrão sintético de (<i>E</i>)-2-octenal (32). Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	179
Anexo 117. Espectro de RMN de ^1H (250,13 MHz, CDCl_3) do padrão sintético de (<i>E</i>) 2-octenal (32). Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	180
Anexo 118. Espectro de RMN de ^{13}C (62,90 MHz, CDCl_3) do padrão sintético de (<i>E</i>)-2-octenal (32). Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	180
Anexo 119. Espectro de RMN de ^1H (250,13 MHz, CDCl_3) do padrão sintético do acetato de (<i>E</i>)-2-hexenila (28). Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	181
Anexo 120. Espectro de RMN de ^{13}C (62,90 MHz, CDCl_3) do padrão sintético do acetato de (<i>E</i>)-2-hexenila (28). Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	181
Anexo 121. Espectro de RMN ^1H (250,13 MHz; CDCl_3) do padrão sintético do (<i>E</i>)-4-oxo-2-hexenal (19). Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	182

Anexo 122. Espectro de RMN de ^{13}C (62,90 MHz, CDCl_3) do padrão sintético do (<i>E</i>) 4-oxo- 2-hexenal (19). Espectro processado no programa <i>TopSpin</i> da Bruker.	182
Anexo 123. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (62,90 MHz, CDCl_3) do padrão sintético do (<i>E</i>)-4-oxo- 2-hexenal (19). Espectro processado no programa <i>TopSpin</i> da Bruker.	183
Anexo 124. Espectro de RMN de ^1H (250,13MHz, CDCl_3)do padrão sintético do (<i>E</i>)-2-hexenol (12). Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	183
Anexo 125. Espectro de RMN de ^{13}C (62,90 MHz, CDCl_3) do padrão sintético do (<i>E</i>)-2-hexenol (12). Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	184
Anexo 126. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (62,90 MHz, CDCl_3) do padrão sintético do (<i>E</i>)-2-hexenol (12). Espectro processado no programa <i>TopSpin</i> da Bruker.	184
Anexo 127. Espectro de RMN de ^1H (250 MHz; CDCl_3) do padrão sintético dodecanal. Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	185
Anexo 128. Espectro de RMN de ^1H (250 MHz; CDCl_3) do N-bromosuccinimida recristalizado. Processamento realizado no programa <i>MestRec</i>	185
Anexo 129. Compostos detectados nas glândulas através da análise por CG-EM	186
Anexo 130. Microscopia eletrônica de varredura da antena de fêmea de percevejo da espécie <i>Phloea subquadrata</i> A: Par de antenas apresentando os três segmentos: escapo, pedicelo e o flagelo. B: Ampliação da região do flagelo da antena com incrustações nas sensilas. C: Base de fixação das sensilas no flagelo. D: Microporos presentes na sensila.	187
Anexo 131. Microscopia eletrônica de varredura da antena de percevejos da espécie <i>Phloea subquadrata</i> A: Par de antenas de macho apresentando os três segmentos: escapo, pedicelo e o flagelo. B: Ampliação da região do flagelo da antena de macho com incrustações. C: Ápice de uma sensila de macho. D: Antena de um indivíduo jovens 5° ínstar da espécie <i>Phloea subquadrata</i> apresentando os três segmentos.....	187

Anexo 132. Microscopia eletrônica de varredura da antena de macho de <i>Phloeophana longirostris</i> . A: Antena completa mostrando os três segmentos: escapo, pedicelo e o flagelo. B: Ampliação da região do flagelo da antena. C e D: Microporos presentes na sensila da região flagelar.	187
Anexo 133. Microscopia eletrônica de varredura da antena de fêmea de <i>Phloeophana longirostris</i> . A: Flagelo e ligação com o pedicelo. B: Ampliação da região de ligação do flagelo com o pedicelo. C: Região do flagelo com as diferentes formas de sensilas e D: Base de uma sensila ligada ao flagelo.	187
Anexo 134. Ovos de <i>Phloeophana longirostris</i> após armazenagem a -20 °C. ...	188
Anexo 135. Ninfas de 1° ínstar de <i>Phloeophana longirostris</i> . A: ninfas eclodidas dos ovos armazenados 2 a 8 °C. B: região ventral com detalhe das antenas. C: região ventral e dorsal das ninfas.....	188
Anexo 136. Ninfas de 2° ínstar de <i>Phloeophana longirostris</i> . A: região ventral e cabeça. B: detalhe do par de antenas com três segmentos. C: região dorsal, mostrando parte do aparelho bucal.....	188
Anexo 137. Ninfas de 3° ínstar <i>Phloeophana longirostris</i> . A: detalhe dos olhos na região dorsal. B: imagem da região do dorso da ninfa com iluminação comum. C: imagem do dorso da ninfa com luz polarizada.	188
Anexo 138. Curva de calibração dos compostos presentes nos indivíduos <i>Phloea subquadrata</i>	190
Anexo 139. Peso médio dos indivíduos de <i>Phloea subquadrata</i> e <i>Phloeophana longirostris</i>	190
Anexo 140. Relação entre o peso médio dos indivíduos de <i>Phloea subquadrata</i> e <i>Phloeophana longirostris</i> submetidos a análises.....	191
Anexo 141. Espectro de massas dos 4 dímeros sintéticos do m/z 112.....	192
Anexo 142. Espectro de massas dos dímeros detectados na glândula de macho de <i>Phloea subquadrata</i>	193
Anexo 143. Cromatograma troca catiônica referente a 1° do processo de purificação das proteínas do extrato solúvel de <i>Bacillus safensis</i> pH 7,6. Linha em azul refere-se ao gradiente de absorbância.	194

Anexo 144. Cromatograma da troca catiônica referente a 2° do processo de purificação das proteínas do extrato solúvel de <i>Bacillus safensis</i> pH 7,6 (na presença do fenantreno). Linha em azul refere-se ao gradiente de absorbância.	194
Anexo 145. Cromatograma da troca catiônica referente ao 3° processo de purificação das proteínas do extrato solúvel de <i>Bacillus safensis</i> pH 7.6. Linha em azul refere-se ao gradiente de absorbância.	195
Anexo 146. Cromatogramas (FPLC-UV) referente à 1° purificação (vermelho, sem fenantreno) e da 2° purificação (azul, com fenantreno) da troca catiônica do <i>Bacillus safensis</i>	195
Anexo 147. Cromatogramas (FPLC-UV) referente à 1° purificação (vermelho, sem fenantreno) e da 2° purificação (rosa, com fenantreno) da troca aniônica do <i>Bacillus safensis</i>	196
Anexo 148. Géis das frações da troca catiônica da segunda purificação de <i>Bacillus safensis</i> . A: com fenantreno. B: sem fenantreno	197
Anexo 149. Géis das frações da troca aniônica da segunda purificação, sem fenantreno em ambos, de <i>Bacillus safensis</i>	197
Anexo 150. Géis das frações da troca aniônica da segunda purificação, com fenantreno em ambos, de <i>Bacillus safensis</i>	197
Anexo 151. Percentual de fluorescência da troca catiônica da 2° purificação....	198
Anexo 152. Análise filogenética de isolados bacterianos, baseado em sequências do gene ribossomal RNAr 16S. O dendograma apresenta a similaridade do micro-organismo CFA 06 com o <i>Bacillus safensis</i> . Análise realizada no CPQBA sobre a responsabilidade da Profa. Valéria de Oliveira Maia de Oliveira.	199
Anexo 153. Análise filogenética de isolados bacterianos, baseado em sequências do gene conservado gyrB. O micro-organismo CFA 06 apresentou 100% de similaridade com o <i>Bacillus safensis</i> . Análise realizada no CPQBA sobre a responsabilidade da Profa. Valéria de Oliveira Maia de Oliveira.	199
Anexo 154. Resultado da busca, em banco de dados, da análise dos peptídeos obtidos a partir da fração proteica da ativa, do <i>Bacillus safensis</i> , apresentando uma proteína sem função conhecida.	200

Anexo 155. Resultado da busca, em banco de dados, de uma amostra do <i>flow through</i> da troca catiônica de <i>Bacillus safensis</i> , revelando uma catalase.....	201
Anexo 156. Estruturas dos aminoácidos e seus respectivos símbolos.	202

CAPÍTULO I.

Ecologia Química de Percevejos da Família Phloeidae

1. INTRODUÇÃO

A comunicação química é universalmente utilizada pelos seres vivos, em todos os níveis da organização biológica, incluindo regulação de células, órgãos e interações ecológicas entre os indivíduos.¹ Os sinais químicos são capazes de transmitir uma grande quantidade de informações que norteiam as relações de um ecossistema.² Nesse contexto, a ecologia química se destaca como a ciência que estuda esses sinais responsáveis pela comunicação entre os mais variados tipos de organismos.³

De maneira geral, os seres vivos percebem o mundo através de pequenas moléculas que carregam informações para o reconhecimento de parceiros e presas além de características específicas do ambiente, como as fontes de alimentos, sítios de desova, entre outros.⁴ Os compostos químicos envolvidos nessa comunicação são denominados semioquímicos, geralmente produzidos pelo próprio organismo a partir das rotas biossintéticas, ou incorporados via alimentação.⁵

De acordo com o alvo de ação, esses semioquímicos podem ser organizados em dois subgrupos: feromônios e aleloquímicos. Os feromônios estão envolvidos na comunicação entre indivíduos de uma mesma espécie (intraespecífico) e de acordo com a sua função, eles podem ser classificados em: sexuais, de alarme, de trilha, entre outros. Já os aleloquímicos, promovem à comunicação entre indivíduos de espécies diferentes. Adicionalmente, a relação custo/benefício para o emissor e o receptor, permite dividir esse grupo em: cairomônios (beneficiam o receptor), alomônios (beneficiam o emissor) e sinomônios (beneficiam ambos, receptor e emissor).⁶

¹ Penn, D.J. *Chemical Ecology: From Gene to Ecosystem*. Dordrecht: Springer. **2006**.

² Dicke, M.; Takken, W. *Chemical Ecology: From Gene to Ecosystem*. Springer. **2006**.

³ Bergström, G. *Pure Appl. Chem.* **2007**, 79, 2305-2323.

⁴ Leal, W.S. *Pheromone Reception*. In *Topics in Current Chemistry*. **2005**, 240, 1-36.

⁵ Chapman, R.F. *The Insects Structure and Function*. 4th Ed. Cambridge University Press. **1998**.

⁶ Wyatt, T. D. *Pheromones and Animal Behaviour*. Cambridge University Press. **2003**.

1.1. Aspectos da Biologia de Percevejos

A classe dos insetos (Insecta) faz parte do filo Arthropoda, e reúne mais de cinco milhões de espécies com aproximadamente um milhão já descritas. Os representantes dessa classe possuem corpo segmentado em três partes distintas (cabeça, tórax e abdômen) cobertas por cutícula. Na cabeça estão localizados os principais órgãos sensoriais como: par de antenas; o aparelho bucal (sugador, mastigador, triturador e lambedor) e olhos ou ocelos. O tórax é o centro locomotor de algumas classes de insetos, onde se encontra a maioria das glândulas.⁷

A ordem dos Hemípteros compreende cerca de 67.500 espécies descritas, distribuídas em três subordens: *Sternorrhyncha*, *Auchenorrhyncha* e *Heteroptera*. Os heteropteras, conhecidos como percevejos, são espécies hemimetábolos, ou seja, apresentam um ciclo de vida com metamorfose incompleta, passando por três fases distintas: ovos, ninfas e adultos.⁸ As ninfas, em muitos casos, assemelham-se à fase adulta, mas não possuem asas e órgãos reprodutivos funcionais. As mesmas apresentam cinco estágios de desenvolvimentos distintos denominados de ínstars. A maioria dos grupos apresenta glândulas odoríferas localizadas na região do tórax que são responsáveis pelo armazenamento dos compostos de defesa. Uma característica evolutiva desses indivíduos é a modificação do aparelho bucal (mandíbula e maxilar) para uma estrutura, denominada estilete perfurante, capaz de perfurar tecidos (geralmente vegetais) e sugar os líquidos (normalmente seiva) como estratégia para alimentação.⁹

A superfamília Pentatomoidae, é composta por aproximadamente 7.000 espécies descritas, distribuídas em 14 famílias das quais 10 (Pentatomidae, Scutelleridae, Cydnidae, Corimelaenidae, Phloeidae, Acanthosomatidae, Canopidae, Dinidoridae, Tessaratomidae e Megarididae) ocorrem na região Neotropical. Entre os pentatomóideos, a forma do corpo predominante é a ovalada, de tamanho médio a grande, em alguns grupos a forma do corpo é quase

⁷ Gillott, Cedric. *Entomology*. 3^{ed}. University of Saskatchewan, Canada. **2005**.

⁸ Lundgren, J.G. *Biological Control*. **2011**. doi:10.1016/j.biocontrol.2011.02.009.

⁹ Martin, J.; Webb, M. *Hemiptera: It's a Bug's Life*. Natural History Museum. **2010**.

indistinta do local de abrigo.¹⁰ Alguns grupos apresentam antenas com cinco ou três segmentos divididos em: escapo, pedicelo e flagelo (Figura 1).

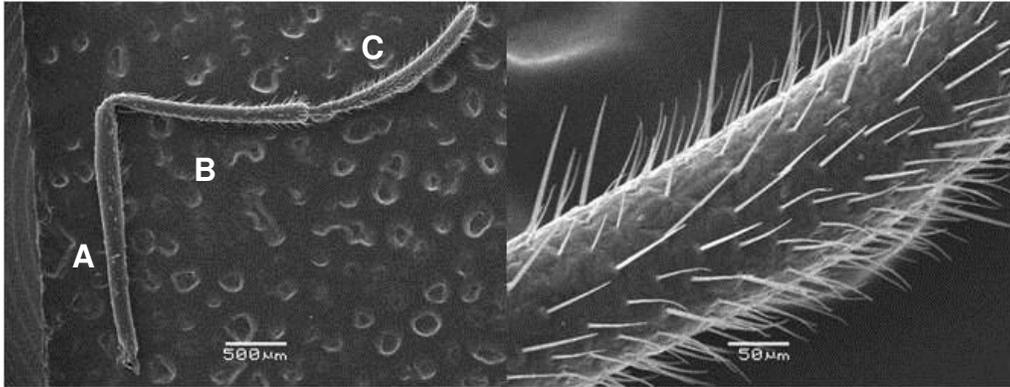


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura da antena de macho de *Phloea subquadrata*, apresentação os três segmentos: escapo (A), pedicelo (B) e flagelo (C). (Foto: Francine Souza Alves Fonseca).

Indivíduos jovens e adultos possuem mandíbulas modificadas do tipo agulha, capazes de retirar seu alimento dos fluidos (seiva) presentes nas variadas partes da planta (raízes, caule, folhas, flores e sementes). O grau do dano causado à planta devido à alimentação do inseto dependerá do seu estágio de desenvolvimento no momento do ataque.

1.2. Família Phloeidae

Os insetos pertencentes à família Phloeidae apresentam o corpo achatado, com expansões lobadas e foliáceas, olhos divididos em uma porção dorsal e outra ventral, e antenas triarticuladas, inseridas anteriormente aos olhos e encobertas pelas expansões cefálicas.

As principais diferenças entre os gêneros incluem a forma dos lobos cefálicos, o comprimento do rostró (aparelho bucal) e do escutelo (tórax) e da genitália de ambos os sexos.¹¹Essa família é relativamente pequena, composta

¹⁰ Schuh, R.T.; Slater, J.A. *True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera)*. Cornell University Press, London. **1995**.

¹¹ Bernardes, J. L. C. *Iheringia*. **2005**, 95, 415-420.

por três gêneros e quatro espécies: *Phloeophana longirostris*, *Phloea corticata* e *Phloea subquadrata*. São encontradas exclusivamente na América do Sul, com registros principalmente no Brasil, desde o Pará até o Rio Grande do Sul.¹²

Esses insetos, considerados sub-sociais, se alimentam diretamente do sistema vascular de suas plantas hospedeiras, particularmente dos vasos condutores de floema. As fêmeas apresentam o cuidado parental com os ovos e com as ninfas dos primeiros ínstaes, e alguns indivíduos apresentam uma tendência de permanecerem em grupos.¹³

Os primeiros estudos sobre os aspectos ecológicos envolvendo as espécies *Phloea subquadrata* e *Phloeophana longirostris* são relativamente recentes.^{14,15} Esses percevejos vivem sobrecasas de árvores, apresentando mimetismo críptico com a planta hospedeira. Essa característica permite que o inseto fique camuflado, conferindo proteção frente aos predadores, sendo esta a sua principal estratégia de defesa.¹⁰ Outro tipo de defesa relacionado à superfamília dos Pentatomoidae é o comportamento de tanatose, ou seja, ele fica como se estivesse morto em épocas específicas do ano para afastar os predadores.¹⁵ Não existe na literatura relatos da defesa química dos insetos pertencentes à família Phloeidae.

Phloea subquadrata é um inseto da família Phloeidae, endêmico do Brasil, que se mantém associado às espécies da família Myrtaceae. O ciclo de vida de *Phloea subquadrata*, que dura cerca de um ano, transcorre sobre o caule das plantas hospedeiras, protegidos pela coloração críptica. As fêmeas exibem cuidado maternal sobre os ovos, e as ninfas permanecem fixadas ao seu abdômen até poucos dias após a primeira muda (Figura 2). Os indivíduos jovens passam então a viver em grupos nos caules, das plantas hospedeiras.^{11,14}

¹² Grazia, J. et. al. *Pentatomoidea*. 1999, 104-110.

¹³ Guilbert, E. *Eur.J.Entomol.* 2003, 61-63.

¹⁴ Salomão, A. T. *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Biologia, UNICAMP, 2007.

¹⁵ Postali, T.C. *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Biologia, UNICAMP, 2009.

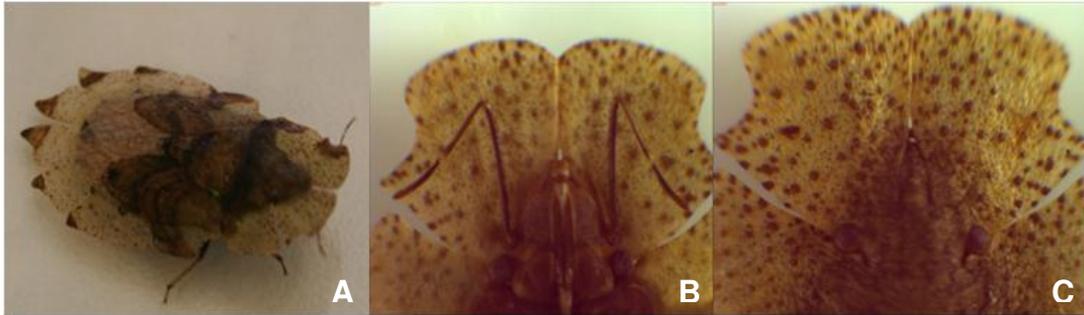


Figura 2. Indivíduos de *Phloea subquadrata*. A: fêmea. B: par de antenas do macho. C: região dorsal da cabeça do macho (Fotos: Francine Fonseca).

Phloeophana longirostris é uma espécie de percevejo que vive sobre troncos de árvores que geralmente apresentam líquens associados a essas plantas. O corpo desse inseto é altamente modificado de maneira a ficar indistinto do substrato. As ninfas de 1º ínstar, no entanto, são esbranquiçadas e permanecem aderidas ventralmente ao abdômen materno. A partir do 2º ínstar, até a fase adulta, esses percevejos apresentam-se dispersos e com coloração semelhante ao tronco da árvore hospedeira (Figura 3).



Figura 3. Indivíduos de *Phloeophana longirostris* em seu habitat natural A: Ninfa de 4º ínstar sobre planta hospedeira. B: Fêmea camuflada sobre a casca da árvore. (Fotos: Francine Fonseca).

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram identificar os compostos voláteis que caracterizam os indivíduos jovens e adultos de duas espécies de percevejo, *Phloea subquadrata* e *Phloeophana longirostris*. Além disso, determinar as glândulas responsáveis pelo armazenamento dos compostos nos diferentes estágios de desenvolvimento desses percevejos. Finalmente, correlacionar os voláteis liberados pelos percevejos às plantas hospedeiras.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor compreensão do texto a seguir, todos os compostos identificados na *Phloea subquadrata* e *Phloeophana longirostris* (adultos e ninfas), foram organizados em duas tabelas. A Tabela 3 refere-se aos compostos voláteis de *Phloea subquadrata*, numerados de **1** ao **56**, de acordo com os índices de retenção. Os compostos da Tabela 4, se referem à *Phloeophana longirostris*, e foram organizados mantendo-se a numeração sequencial da Tabela 3 e incluindo os novos compostos detectados somente nessa espécie. Essa numeração é seguida ao longo deste capítulo. O índice de retenção dos compostos e as estruturas químicas são apresentados no Anexo 6.

3.1. Composição Química do Extrato Total de *Phloea subquadrata*

A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) do extrato total de *Phloea subquadrata* permitiu identificar os compostos mais abundantes dos indivíduos jovens e adultos verificando-se as alterações relacionadas ao estágio de desenvolvimento desta espécie. De maneira geral, os hidrocarbonetos saturados undecano (**37**) e tridecano (**50**), e o aldeído insaturado (*E*)-2-hexenal (**10**), são característicos dos indivíduos jovens e adultos desta espécie (Figura 4).

Os hidrocarbonetos saturados de 10 a 14 carbonos são normalmente encontrados nos extratos de várias espécies de percevejos como compostos majoritários. Curiosamente, na espécie em estudo, *Phloea subquadrata*, o undecano (**37**) é o composto predominante. No entanto, para a espécie *Tessaratoma papillosa* o tridecano (**50**) é encontrado em 47% nas fêmeas e 51,8% nos machos.¹⁶ Esses compostos podem atuar como surfactantes, perturbando a camada lipídica da cutícula de predadores e, quando misturados a outros compostos, como os aldeídos insaturados, podem apresentar função

¹⁶ Li, R.; et. al. *Neotrop. Entomol.* **2012**,41, 278-28.

feromonal.¹⁷ Além disso, é reportado que esses hidrocarbonetos alifáticos atuam como solventes, modulando a evaporação dos outros compostos presentes nas secreções.¹⁸

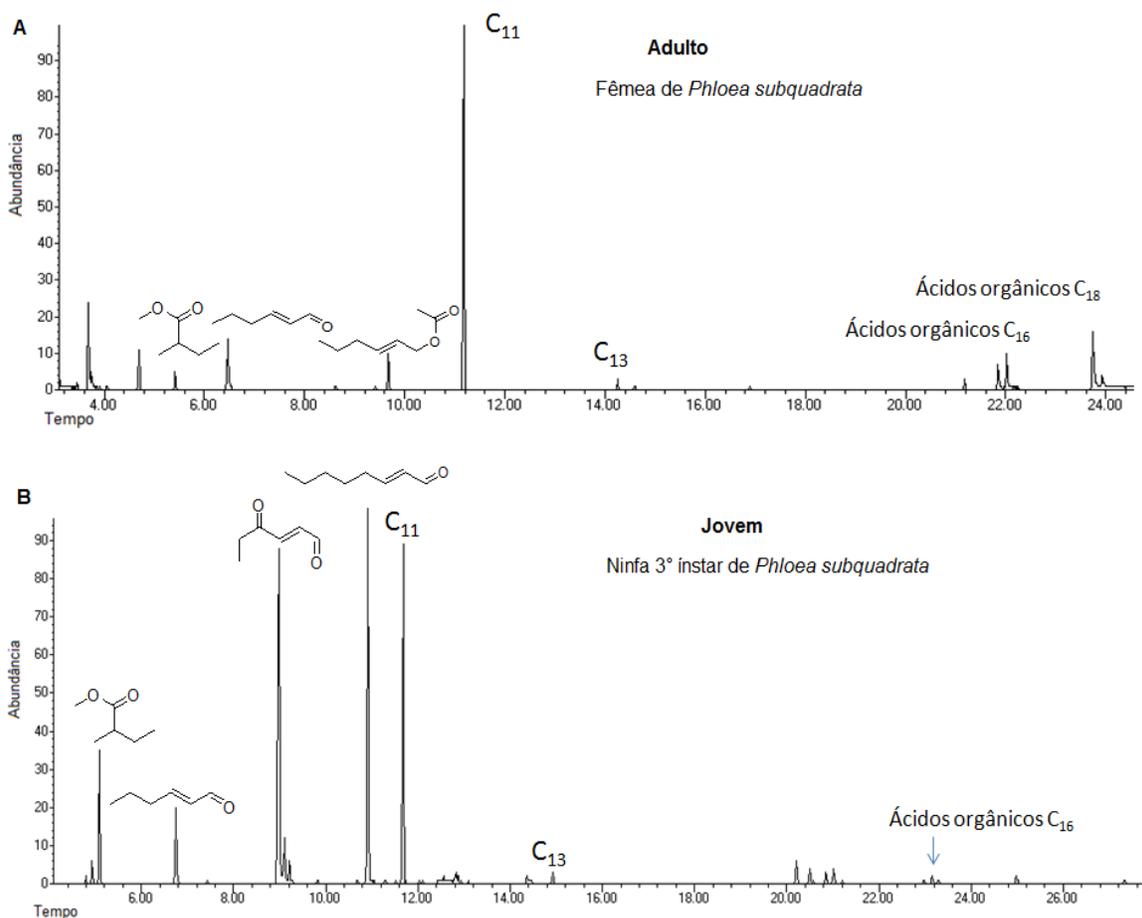


Figura 4. Cromatogramas de íons totais (CG-EM) dos compostos presentes no extrato total dos insetos analisados. Condição de análise: 40°C (3min), seguida de 10°C/min até 290°C.

O composto (*E*)-2-octenal (**32**), abundante nas ninfas, apresenta um odor forte e irritante que predomina nos extratos dos indivíduos jovens. Para outras espécies de percevejo, esse composto é também encontrado em ninfas, sendo majoritário nos estágios juvenis mais avançados (4° e 5° ínstars), apresentando função de alarme e defesa contra predação.¹⁹ Especificamente, nos

¹⁷ Gunawardena, N.E.; Herath, H.M.W.K.B.J. *Chem. Ecol.* **1991**, 17-12.

¹⁸ Aldrich, J.R. *Ann. Rev. Entomol.* **1988**, 33, 211, 238.

¹⁹ Leal, W. S.; et. al. *J. Chem. Ecol.* **1995**, 21, 7.

cromatogramas obtidos através das análises das ninfas, foram detectados quatro compostos de m/z 224, ainda desconhecidos, que apresentam o dobro da massa do (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**, m/z 112).

No preparo dos extratos dos indivíduos adultos, principalmente de machos, um aroma frutal adocicado foi exalado das amostras. O composto responsável por essa característica é o acetato de (*E*)-2-hexenila (**28**), detectado apenas nos adultos.²⁰ Este composto, pela sua característica olfativa, levou a identificação do mesmo entre os constituintes dos feromônios sexuais de machos da espécie *Oncopeltus fasciatus*.²¹

Todos os compostos encontrados nos extratos dessa espécie *Phloea subquadrata* (aldeídos insaturados, hidrocarbonetos saturados, ésteres e ácidos orgânicos) são comumente encontrados em várias espécies da subordem heteroptera (Figura 5).²²

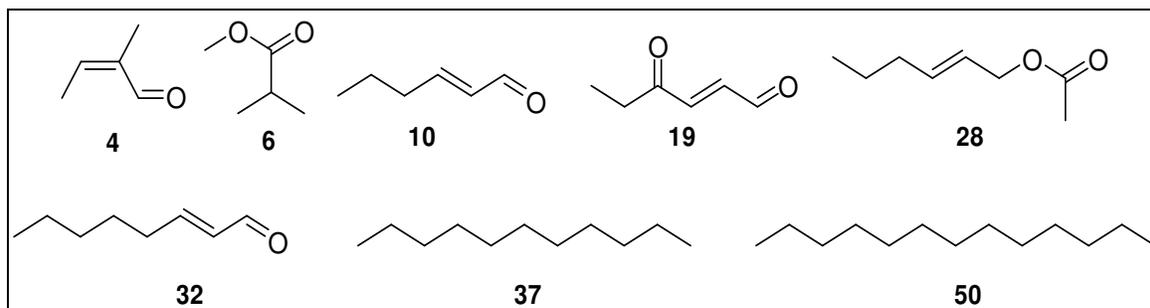


Figura 5. Compostos detectados nos extratos totais de indivíduos de *Phloea subquadrata*.

3.1.1. Quantificação dos compostos presentes no extrato total

Para realizar os bioensaios, foi necessário quantificar os compostos majoritários presentes no extrato total de indivíduos jovens e adultos de *Phloea subquadrata*.

²⁰ Zhang, Q.; Aldrich, J. *J. Chem. Ecol.* **2003**, 298, 1835-1851.

²¹ Aldrich, J. R.; *et. al. Chemoecol.* **1999**, 9, 63-71.

²² Bergmann, J.; González, A.; Zarbin, P. H. G. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, 20, 7, 1206-1219.

Portanto os fatores resposta (FR) e os coeficientes de correlação (R) foram obtidos através de curvas de calibração para os sete compostos de interesse a partir de padrões sintéticos (Tabela 1).

Tabela 1. Figuras de mérito para os compostos de interesse

Compostos	FR ^a	R ²
Cariofileno	0,226	0,999
Dodecano	0,294	0,996
Undecano	0,316	0,993
Decano	0,335	0,993
2-(<i>E</i>)-hexenal	0,405	0,990
2-(<i>E</i>)-octenal	0,424	0,998
acetato de (<i>E</i>)-2-hexenila	0,483	0,996

^aFR relativo a concentração do padrão interno (dodecanal) (0,248 mg·mL⁻¹).

As curvas de calibração foram obtidas considerando-se seis níveis de concentração em relação a uma concentração fixa de padrão interno (dodecanal 0,248 mg·mL⁻¹), injetadas em triplicata. As curvas foram então obtidas por regressão linear e R² foi considerado como uma estimativa da qualidade das curvas obtidas, quanto mais próximo de 1,0 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais em relação à reta obtida e menor a incerteza dos fatores resposta estimados (Anexo 138).

Dentre os hidrocarbonetos alifáticos que foram quantificados, o undecano (**37**) foi o mais abundante em todos os indivíduos analisados, seguido dodecano (**10**), No entanto, o dodecano (**42**) só foi detectado e quantificado nas ninfas. O acetato de (*E*)-2-hexenila (**28**), quantificado apenas nos adultos, apresentou nas fêmeas uma quantidade significativamente maior em relação à quantidade desse composto nos machos (Tabela 2).

Tabela 2. Quantificação dos compostos majoritários (em mg/g de inseto) de *Phloea subquadrata*

Compostos	Fêmeas ^a	Machos ^b	Ninfas ^c (2°, 3° e 4° ínstars)
(E)-2-hexenal	2,33±0,84	0,23 ± 0,05	0,39±0,53
decano	0,11±0,03	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,01
acetato de (E)-2-hexenila	6,19 ± 3,83	0,4 ± 0,30	-
(E)-2-octenal	-	-	1,97±1,20
undecano	11,34 ± 3,77	8,85 ± 0,40	4,88 ± 2,61
dodecano	-	-	0,8±0,50

(-) compostos não detectados por CG-EM. ^aValores médios referentes a 6 indivíduos; ^bValores médios referentes a 4 indivíduos; ^cValores médios referentes a 18 indivíduos.

Esses dados serão utilizados em teste de campo de maneira a revelar a função dos compostos.

3.2. Composições Químicas dos Voláteis

Os compostos voláteis de *Phloea subquadrata* foram coletados por duas técnicas diferentes: o *headspace* dinâmico, utilizando o polímero Porapak-Q[®], com fluxo de ar controlado; e *headspace* estático com o uso da micro-extração em fase sólida (SPME). No entanto, como a técnica de *headspace* estático por (SPME) se apresentou mais eficiente, somente ela foi utilizada para coleta dos voláteis da espécie *Phloeophana longirostris*.

3.2.1. *Headspacedinâmico* dos voláteis de *Phloea subquadrata*

A técnica de *headspace* dinâmico foi empregada, por ser uma das mais utilizadas na coleta dos voláteis de insetos. A pré-concentração dos compostos voláteis foi realizada em um adsorvente constituído de etilvinilbenzeno entrecruzado com divinilbenzeno, comercialmente conhecido por Porapak-Q[®].²³

Os extratos obtidos por dessorção com solvente orgânico (acetato de etila) foram submetidos à análise por CG-EM. Os resultados, no entanto revelaram que

²³ Byrne, K.; et. al. *J. Chem. Ecol.* **1975**, 1, 7-1.

partes dos compostos presentes nos cromatogramas tratavam-se de produtos da decomposição do adsorvente (Figura 6).

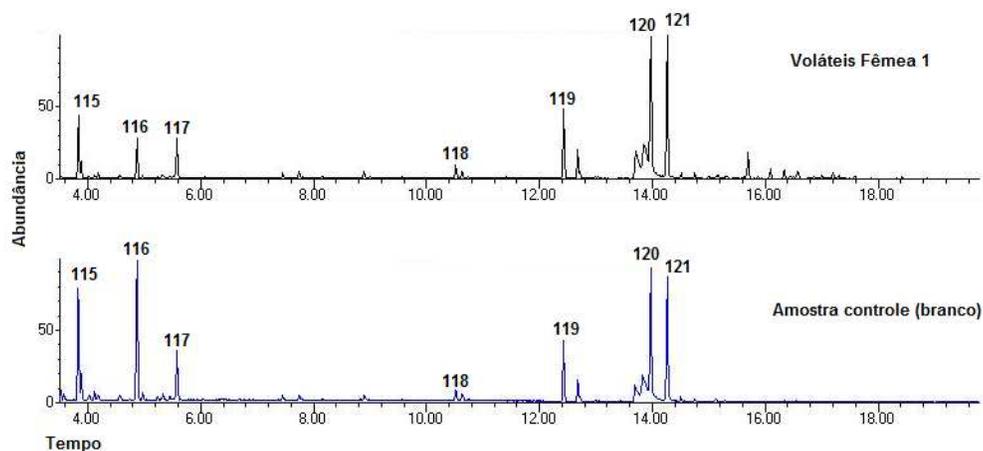


Figura 6. Cromatograma de íons totais (CG-EM) dos voláteis utilizando Porapak-Q[®], e seus produtos de decomposição. Condições de análise: 40 °C (3 min), seguida de 10 °C·min⁻¹ até 290 °C. Numeração dos picos no cromatograma conforme a Figura 7.

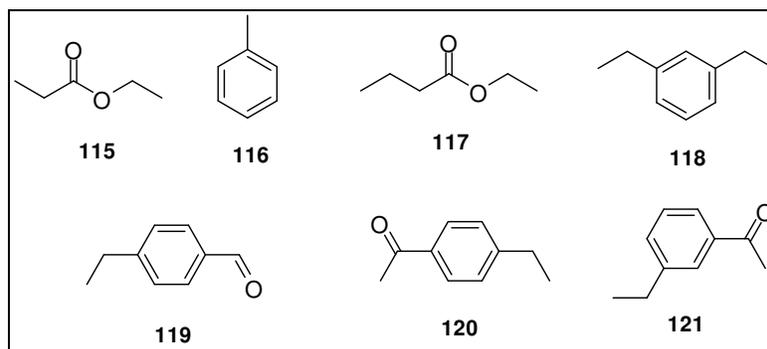


Figura 7. Compostos detectados por CG-EM provenientes da decomposição do Porapak-Q[®].

Através da análise da amostra controle (branco), em comparação com os voláteis detectados nas fêmeas, foi possível identificar alguns produtos que podem ser provenientes da decomposição do adsorvente. Esses compostos foram identificados pela comparação dos espectros de massas obtidos, com a biblioteca *Wiley 275*. Entre eles podemos destacar o propionato de etila (**115**), tolueno (**116**), butirato de etila (**117**), 1,3-dietilbenzeno (**118**), 4-etil-benzaldeído (**119**), 1-(4-

etilfenil)-etanona (**120**) e a 1-(3-etilfenil)-etanona (**121**). Alguns desses compostos já foram relatados como artefatos provenientes do Porapak-Q[®].^{24,25}

Apesar dos produtos de decomposição (Figura 7), foi possível verificar a presença de alguns compostos no cromatograma (Figura 6) na região de 15 a 17 minutos que foram detectados apenas na amostra dos voláteis da fêmea. De acordo com os espectros de massas e o índice de retenção, trata-se dos seguintes compostos: α -copaeno (**84**), β -elemeno (**86**), β -aromadendreno (**90**) e α -aromadendreno (**91**) (Figura 8).

Nenhum desses sesquiterpenos é comum aos hemípteros, no entanto eles são encontrados em diferentes ordens como lepidoptera (α -aromadendreno), coleóptera, himenóptera e díptera (α -copaeno e o β -elemeno).²⁶ Além de serem encontradas nos insetos, essas moléculas contemplam um grupo de voláteis liberados pelas plantas, como defesa química, em resposta ao ataque de insetos.²⁷

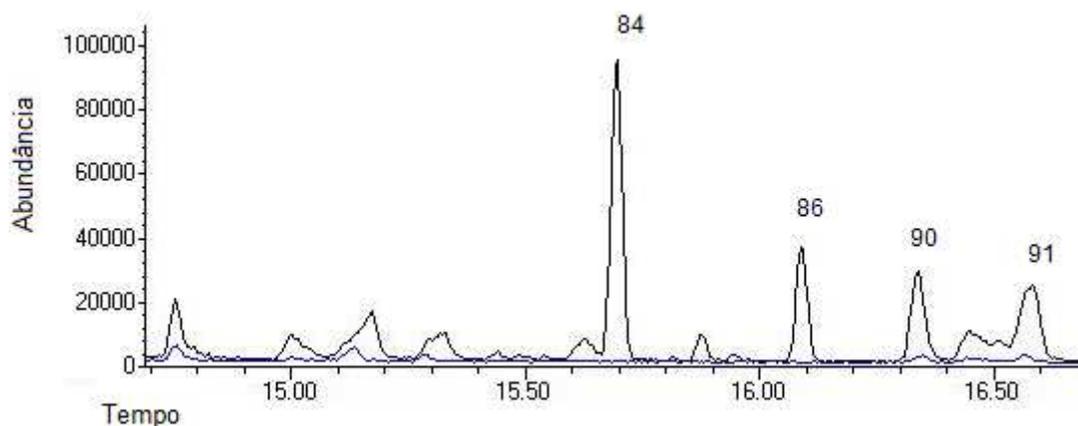


Figura 8. Ampliação dos cromatogramas de íons totais (CG-EM) da Figura 6 da região de compostos voláteis exclusivos das fêmeas. Em azul a análise controle (branco) e em preto, análise da fêmea de *Phloea subquadrata*. Numeração dos picos conforme Anexo 6 e Tabela 3.

Nos indivíduos machos, nenhum composto foi detectado (Anexo 5), porém nos voláteis das ninfas de 5^o ínstar foram detectados o (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**),

²⁴ Sturaro, A.; Parvoli, G.; Doretti, L. *Chromatographia*. **1992**, 33, 53-57.

²⁵ Agelopoulos, N. G.; Pickett, J. A. *J. Chem. Ecol.* **1998**, 24, 1161-1172.

²⁶ <http://www.pherobase.com/database/compound/compounds>

²⁷ Tumlinson, J. H.; Lait, C. G. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **2005**, 58, 54-68.

(*E*)-2-octenal (**32**) e o undecano (**37**), quase na mesma proporção (Figura 9). Os compostos (**19**) e (**32**) são reportados como repelentes de predadores comuns a várias espécies de percevejos.²⁸

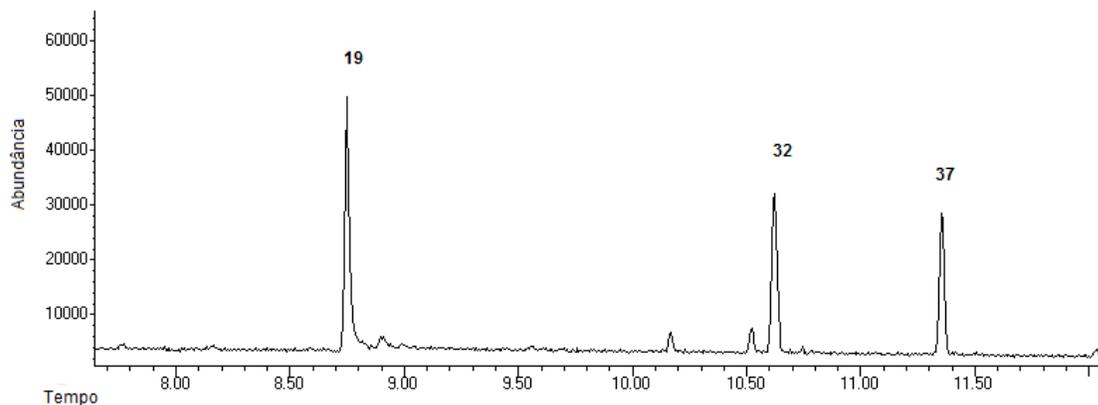


Figura 9. Ampliação do cromatograma de íons totais (CG-EM), referente à região dos voláteis da ninfa de 5º ínstar. Condições de análise: 40 °C (3 min), seguida de 10 °C·min⁻¹ até 290 °C. Numeração dos picos no Anexo 6. Cromatograma completo Anexo 4.

3.2.2. *Headspace* estático (SPME) dos voláteis de *Phloea subquadrata*

Para a análise dos indivíduos jovens e dos adultos (machos e fêmeas), da espécie *Phloea subquadrata*, os voláteis foram extraídos por (SPME) e analisados por (CG-EM), onde os analitos foram termicamente dessorvidos.²⁹ Através dessa análise, foi possível identificar 56 compostos distribuídos entre machos e fêmeas e nos diferentes estágios de desenvolvimento juvenis. Esses compostos foram identificados através da interpretação dos espectros de massas e comparação com os índices de retenção com da literatura (Anexo 6).

Os principais compostos detectados nestes percevejos foram o (*E*)-2-hexenal (**10**), (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**), decano (**24**), acetato de (*E*)-2-hexenila (**28**), (*E*)-2-octenal, undecano (**37**) e o tridecano (**50**) (Figura 10, Tabela 3).

²⁸Noge, K.; Prudic, K. L.; Becerra, J. X. *J. Chem. Ecol.* **2012**, 38, 1050-1056.

²⁹Augusto, F.; Valente, A. L. P. *Trends in Anal. Chem.* **2002**, 21, 7.

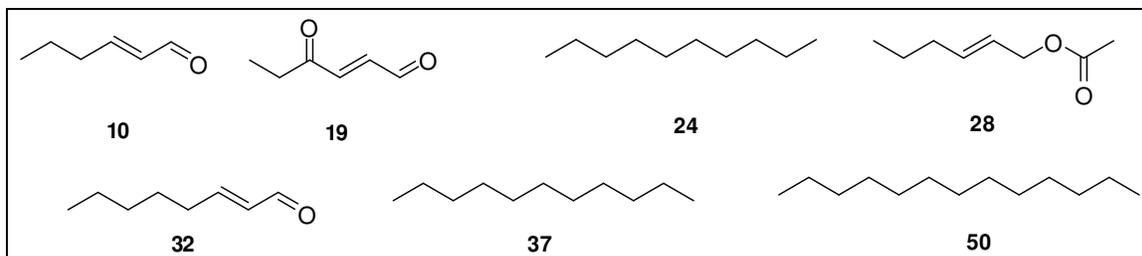


Figura 10. Principais compostos voláteis detectados nos indivíduos de *Phloea subquadrata*.

Para verificarmos os principais componentes dentre os 56 compostos identificados nos jovens e adultos, utilizamos a análise discriminatória por quadrados mínimos parciais PLS-DA (*partial least squares discriminant analysis*).³⁰

O método utilizado foi à análise multivariada de dados, conciliando-se a análise de componentes principais (ACP) e a análise discriminante (AD) como meio para redução do número de atributos (variáveis) na avaliação dos voláteis dos insetos. Os escores gerados pela componente principal são transformados em índices de importância dos atributos. Estes índices são vinculados à análise discriminante, a qual classifica as amostras em diferentes classes de formulação, e uma medida de desempenho da classificação (geralmente acurácia) é calculada.³¹

Os insetos pertencentes ao 5º ínstar, da espécie *Phloea subquadrata*, não foram inclusos nas análises de PLS-DA, devido ao reduzido número de amostra.³² Além desse grupo, as ninfas de 1º instar também não foram incluídas, pela ausência de compostos voláteis detectados após estímulo. Esta ausência de liberação de compostos ocorre quando as ninfas são recém-eclodidas e as suas estruturas glandulares permanecem como não funcionais.³³

Foram analisados os compostos voláteis de 29 indivíduos da espécie *Phloea subquadrata* nas condições de repouso e logo após estímulo (Figura 11, Tabela 3).

³⁰ Análise estatística realizada em colaboração com o MSc. Thiago Inácio Barros Lopes (IQ-UNICAMP).

³¹ Barker, M; Raynes, W. *J. Chemometrics*. **2003**, 17, 166-173.

³² Ferreira, M.M.C.; et. al. *Química Nova*. **1999**, 22, 5, 724-731.

³³ Weirauch, C. *Dtsch. Entomol. Z.* **2006**, 53, 1, 91-102.

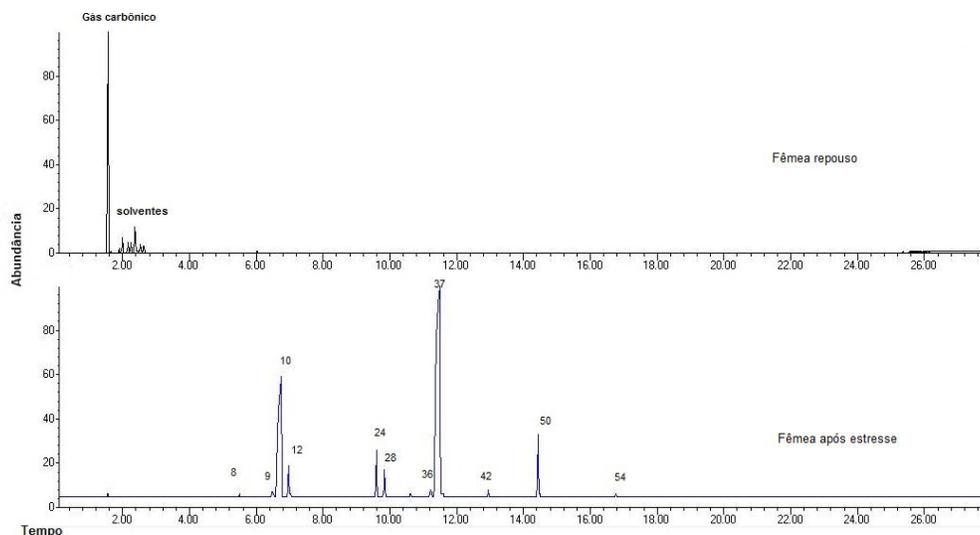


Figura 11. Cromatogramas de íons totais (CG-EM/SPME) dos voláteis de fêmea de *Phloea subquadrata* em repouso e após condição de estímulos. Condições de análise: 40°C (3 min), seguida de 10°C·min⁻¹ até 290°C. Numeração sobre os picos correspondem Tabela 3.

As estruturas dos constituintes químicos majoritários foram confirmadas pela comparação dos espectros de massas obtidos, com a biblioteca *Wiley 275*, padrões sintéticos e índices de retenções relativos. As estruturas dos aldeídos insaturados (**10**) e (**32**) foram comprovadas pela co-injeção de padrões, os demais pelo comportamento linear da série homóloga obtida no cromatograma de íons totais.

Para análise discriminante entre os indivíduos jovens e adultos, o modelo de PLS-DA foi construído utilizando-se 32 indivíduos (20 jovens e 12 adultos). Através desse modelo, foi possível verificar a presença de dois grupos ao longo da CP1. De acordo com a Figura 12 é possível verificar um padrão de distribuição mais disperso para as ninfas em relação aos adultos. Esse fato pode estar relacionado com a tendência em discriminar os três diferentes estágios de desenvolvimento juvenis (2°, 3° e 4° ínstars) que foram considerados como um único grupo nesta análise.

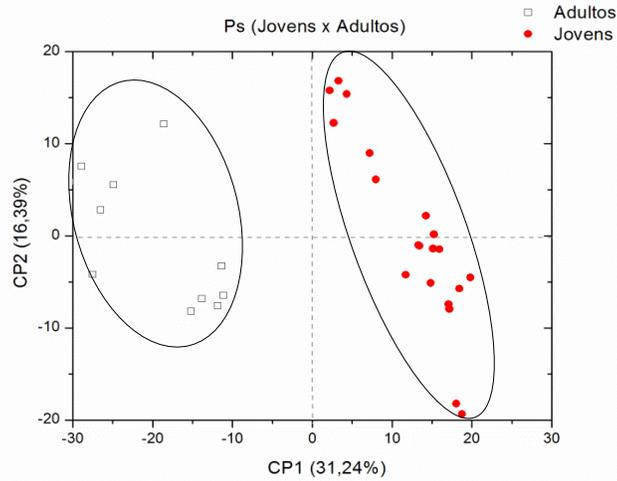


Figura 12. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (4 CP; 58,67% da informação presente nos dados originais; $R_{val} = 0,95$; $R_{cal} = 0,99$), mostrando a discriminação dos indivíduos jovens e adultos da espécie *Phloea subquadrata*.

Os compostos que foram responsáveis pela discriminação entre jovens e adultos foram detectados de maneira exclusiva em um dos grupos. De acordo com o gráfico de pesos (Figura 13), foi possível verificar a distinção de algumas classes de compostos para os adultos (acetatos, álcoois e sesquiterpenos) e para os jovens (cetonas, oxo-aldeídos e alguns aldeídos insaturados).

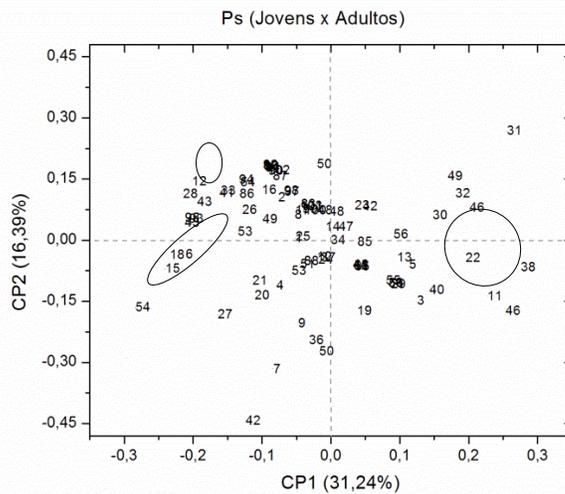


Figura 13. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 12, destacando os compostos relevantes na distinção de indivíduos jovens e adultos da espécie *Phloea subquadrata*.

De acordo com a Figura 14, os compostos (*E*-4-oxo-2-hexenal (**19**) e o (*E*-2-octenal (**37**) foram abundantes em todos os ínstares. É perceptível pelo odor liberado pelas ninfas, que as suas defesas químicas tendem a ser mais irritantes e punjentes quando comparadas com os adultos.¹¹

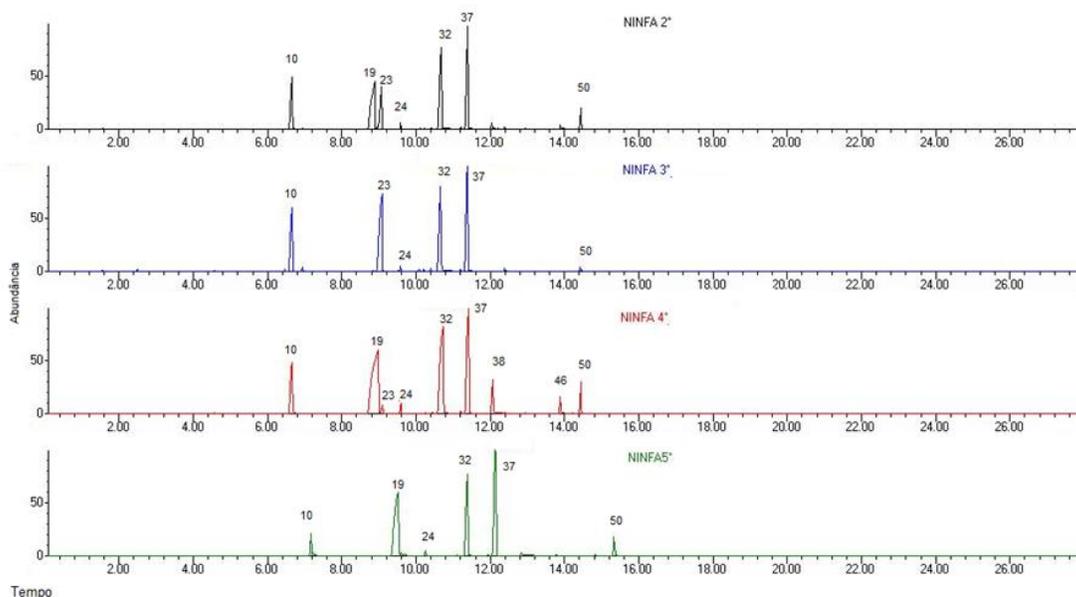


Figura 14. Cromatogramas de íons totais (CG-EM/SPME) dos voláteis dos jovens (2° ao 5° ínstares) *Phloea subquadrata*, após estímulo. Condições de análise: 40°C (3 min), seguida de 10 °C·min⁻¹ até 290°C. Numeração sobre os picos correspondem aos compostos Tabela 3.

Além de serem detectados apenas nas ninfas (Tabela 3), os compostos 5-metil-2(3H)-furanona (**11**), 5-etil-2(3H)-furanona (**22**), (*Z*)-2-octenal (**31**), 2-isopropilciclohexanona (**38**) e (*E*)-2-decenal (**46**), foram responsáveis pela discriminação dos jovens em relação aos adultos (Figura 13).

No entanto, os compostos 2-metilbutanoato de metila (**6**), (*E*)-2-hexen-1-ol (**12**), 2,4-hexadienal (**15**), acetato de (*E*)-2-hexenila (**28**) e α -cariofileno (**54**) foram detectados apenas nos adultos (Figura 13, Tabela 3).

A análise de PLS-DA revelou uma tendência de discriminação dos indivíduos jovens segundo os respectivos ínstares ao longo da bissetriz dos quadrantes pares (Figura 15).

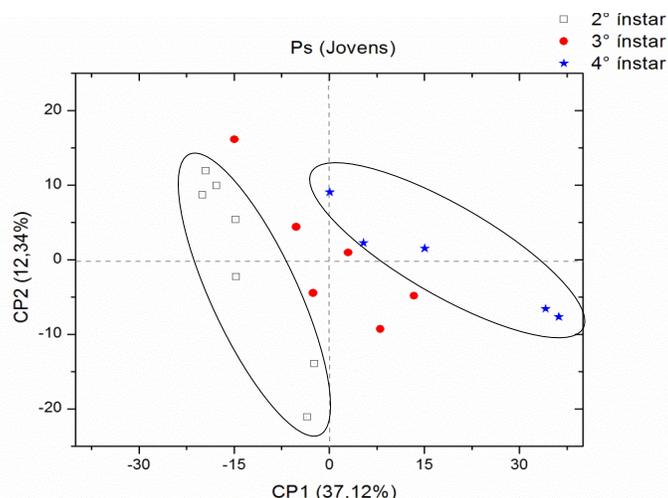


Figura 15. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (3 CP; 77,37% da informação presente nos dados originais; $R_{val} = 0,95$; $R_{cal} = 0,99$), mostrando a discriminação dos indivíduos jovens da espécie *Phloea subquadrata* nos respectivos ínstares ao longo da bissetriz dos quadrantes pares.

Nas ninfas de 2º a 5º instar de *Phloea subquadrata*, os compostos majoritários foram: (*E*)-2-hexenal (**10**), (*E*)-2-octenal (**32**) e (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**), além do undecano (**37**). No entanto, os compostos 5-metil-2(3H)-furanona (**11**), 5-etil-2(3H)-furanona (**22**), 2-isopropilciclohexanona (**38**), 2-propilciclohexanona (**40**) e (*E*)-2-decenal (**46**) foram encontrados apenas em indivíduos jovens (Tabela 3).

A análise do gráfico de pesos (Figura 16) permitiu identificar os compostos responsáveis pela distinção dos ínstares. O (*E*)-2-decenal (**46**) apresentou uma abundância relativa média de 2,0% e discriminou as ninfas de 4º instar dos demais indivíduos. Para os indivíduos do 3º instar, o (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**) foi discriminante, apresentando 41% abundância relativa média nessa espécie. Já os indivíduos do 2º instar foram agrupados pela presença do composto desconhecido **13** (Anexo 19) e do (*Z*)-2-octenal (**31**) (Figura 16, Tabela 3).

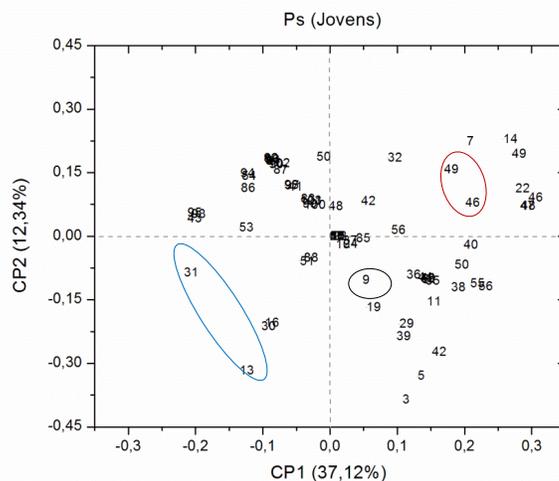


Figura 16. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 15, destacando os compostos relevantes na distinção dos instares de *Phloea subquadrata*.

Visto que esses compostos foram detectados após estímulo, essa distinção em dois grupos indica a relação entre o estágio de desenvolvimento do inseto com as defesas químicas.³⁴

Os adultos de *Phloea subquadrata* (machos e fêmeas), após estímulo, liberaram um odor adocicado e nada irritante. As análises desses compostos voláteis revelaram a presença de (*E*)-2-hexenol (**12**), acetato de (*E*)-2-hexenila (**28**) e β -humuleno (**53**) (Figura 17, Tabela 3).

³⁴ Farine, J.P; *et.al.J. Chem. Ecol.***1992**,18, 1, 65-76.

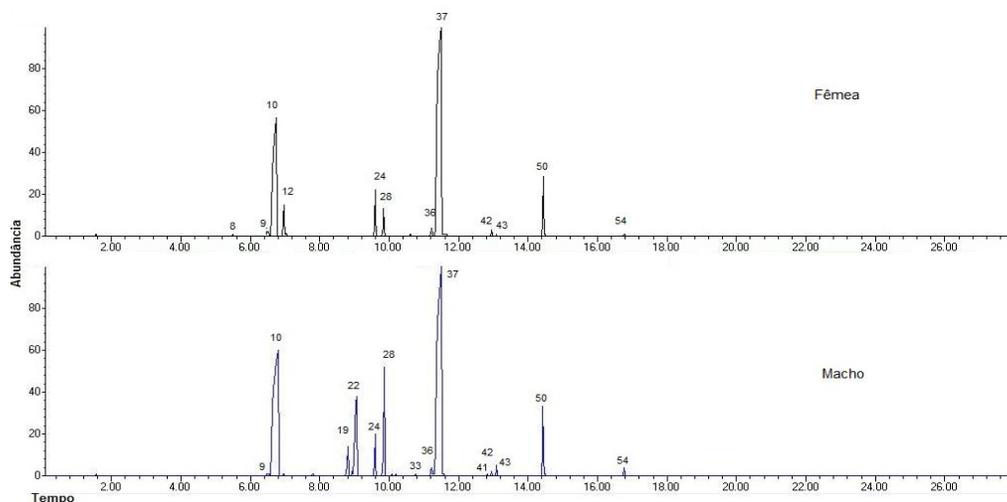


Figura 17. Cromatogramas de íons totais (CG-EM/SPME) dos voláteis de macho e fêmea de *Phloea subquadrata*. Condição de análises: 40°C (3min), 10°C·min⁻¹ até 290°C. Numeração sobre os picos correspondem aos compostos da Tabela 3.

Para análise dos indivíduos adultos o modelo de PLS-DA foi construído utilizando-se 12 indivíduos (seis machos e seis fêmeas). Com esse modelo, foi possível verificar a separação de dois grupos ao longo da CP1 (Figura 18).

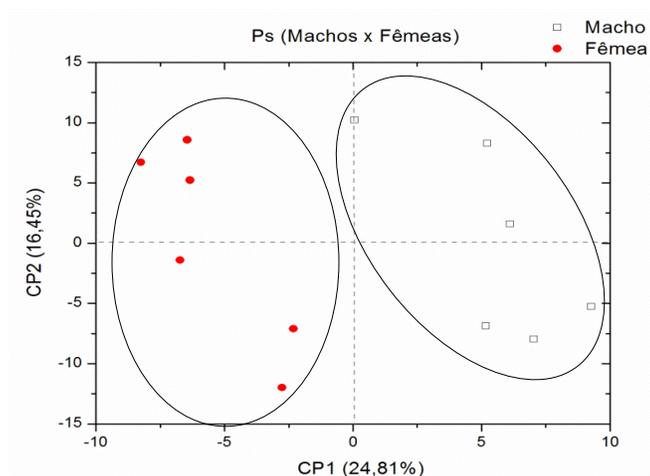


Figura 18. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (6 CP; 81,24% da informação presente nos dados originais; $R_{val} = 0,89$; $R_{cal} = 0,99$), mostrando a discriminação dos indivíduos machos e fêmeas da espécie *Phloea subquadrata* ao longo de CP1.

Os compostos 1-penten-3-ona (**1**), 2-etil-furano (**2**) e β -humuleno (**53**) foram encontrados apenas em machos (Tabela 3). Já o hexanal (**8**), nonano (**14**) e o acetato de 4-metilcicloexanol (**33**) foram detectados apenas em fêmeas. Estes resultados indicam uma distinção, em relação aos compostos voláteis detectados,

entre machos e fêmeas o que poderá auxiliar nas pesquisas por feromônios sexuais dessa espécie. De acordo com o gráfico de pesos (Figura 19), outros compostos também foram representativos como o (*E*)-2-pentenal (**5**) e a 5-etil-2(5H)-furarona (**30**) encontrados apenas nos machos (Tabela 3 e Anexo 6).

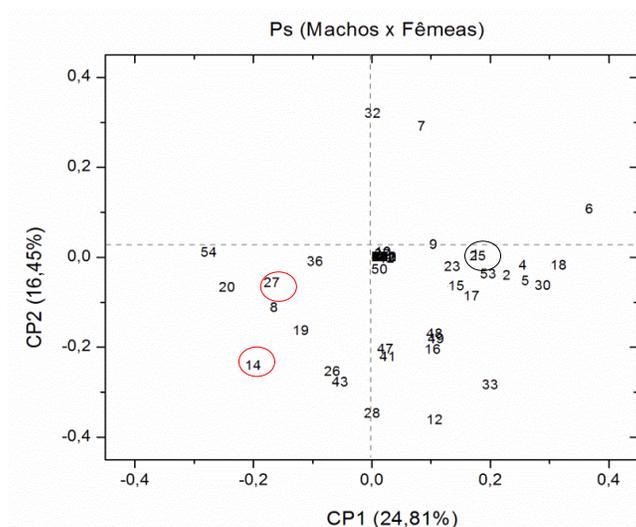


Figura 19. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 18, destacando os compostos relevantes na distinção dos indivíduos adultos *Phloea subquadrata*.

Machos, fêmeas e as ninfas de *Phloea subquadrata* apresentaram compostos voláteis comuns entre eles. Porém, através da análise de PLS-DA foi possível discriminar moléculas capazes de atuar como marcadores químicos em cada um dos grupos. Vale ressaltar, que esses compostos detectados e analisados foram sempre liberados pelos insetos após estímulo.

O inseto não libera todo o conteúdo glandular de uma única vez, um mesmo indivíduo foi submetido a duas situações de estímulo independentes e consecutivas, sendo que a cada estímulo, os voláteis foram coletados por SPME e analisados por CG-EM. Verificamos que os mesmos voláteis eram liberados no primeiro e no segundo estímulo, indicando que a liberação ocorre de forma escalonada. No entanto, o comportamento do inseto foi alterado no segundo estímulo, quando os indivíduos adultos esboçaram comportamento de fuga, enquanto os jovens entravam em tanatose.

Tabela 3. Abundância relativa (%) referente à média e desvio padrão da composição química dos voláteis de *Phloea subquadrata*

N°	Compostos e/ou m/z	Macho	Fêmea	Ninfa 2°	Ninfa 3°	Ninfa 4°	Ninfa 5°
1	1-penten-3-ona	0,06 ± 0,06	-	-	-	-	-
2	2-etilfurano	0,01 ± 0,00	-	-	-	-	-
3	2-vinilfurano	-	-	0,05 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,03	-
4	2-metil-2-butenal	0,04 ± 0,02	-	-	-	-	-
5	(E)-2-pental	0,04 ± 0,01	-	0,11 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,05 ± 0,01
6	2-metilbutanoato de metila	0,05 ± 0,02	0,02 ± 0,01	-	-	-	-
7	2-metil-3-pental	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,03	-	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,00	-
8	(E)-3-hexenal	-	0,09 ± 0,10	-	-	-	-
9	(Z)-2-hexenal	0,21 ± 0,13	0,21 ± 0,16	0,08 ± 0,07	0,09 ± 0,10	0,05 ± 0,04	0,03 ± 0,01
10	(E)-2-hexenal	25,24 ± 4,13	23,07 ± 7,89	14,51 ± 13,61	7,65 ± 7,12	6,87 ± 2,79	3,33 ± 0,13
11	5-metil-2(3H)-furanona	-	-	0,48 ± 0,28	0,96 ± 0,35	0,24 ± 0,07	0,89 ± 0,07
12	(E)-2-hexen-1-ol	0,22 ± 0,11	0,30 ± 0,24	-	-	-	-
13	Desconhecido	-	-	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,01	-	-
14	Nonano	-	0,01 ± 0,01	-	-	0,03 ± 0,02	-
15	2,4-hexadienal	0,09 ± 0,04	0,04 ± 0,03	-	-	-	-
16	acetato de 3-metil-2-butenila	0,05 ± 0,04	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,04	-	-	-
17	hexanoato de metila	0,02 ± 0,01	-	-	-	-	-
18	3-hepten-2-ona	0,06 ± 0,01	0,01 ± 0,01	-	-	-	-
19	(E)-4-oxo-2-hexenal	2,19 ± 0,90	0,57 ± 0,48	22,71 ± 15,47	41,13 ± 6,5	5,32 ± 3,68	33,59 ± 1,99
20	3-metilexanoato de metila	0,18 ± 0,09	0,08 ± 0,07	-	-	-	-
22	5-etil-2(3H)-furanona	-	-	-	0,44 ± 0,19	10,56 ± 9,51	0,44 ± 0,17
23	Desconhecido	4,92 ± 3,62	6,57 ± 5,85	15,01 ± 9,43	0,78 ± 0,12	8,39 ± 5,99	1,28 ± 0,74
24	Decano	2,32 ± 0,72	1,88 ± 0,51	0,72 ± 0,29	0,57 ± 0,19	0,84 ± 0,12	0,71 ± 0,41
25	acetato de (Z)-3-hexenila	0,03 ± 0,01	-	-	-	-	-
26	acetato de (Z)-2-hexenila	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01	-	-	-	-
27	acetato de hexila	0,12 ± 0,09	0,10 ± 0,08	-	-	-	-
28	acetato de (E)-2-hexenila	10,35 ± 5,29	27,15 ± 3,51	-	-	-	-
29	desconhecido	-	-	0,40 ± 0,39	-	0,34 ± 0,16	-
30	5-etil-2(5H)-furanona	0,14 ± 0,08	-	0,45 ± 0,36	0,19 ± 0,14	0,15 ± 0,05	0,06 ± 0,03
31	(Z)-2-octenal	-	-	0,29 ± 0,12	0,35 ± 0,19	0,38 ± 0,31	0,21 ± 0,05

32	(<i>E</i>)-2-octenal	0,08 ± 0,05	0,14 ± 0,08	22,25 ± 2,75	22,18 ± 2,62	27,39 ± 4,75	24,91 ± 3,97
33	desconhecido	0,09 ± 0,05	0,03 ± 0,01	-	-	-	-
35	2-ciclohexen-1,4-diona	-	-	-	-	0,19 ± 0,03	-
36	1-undeceno	0,45 ± 0,23	0,53 ± 0,15	0,28 ± 0,09	0,16 ± 0,06	0,28 ± 0,08	0,18 ± 0,07
37	undecano	55,04 ± 6,79	50,52 ± 9,88	23,84 ± 7,61	19,85 ± 2,53	28,18 ± 7,56	26,08 ± 6,05
38	2-isopropilcicloexanona	-	-	1,07 ± 0,49	3,58 ± 0,93	2,42 ± 1,79	3,55 ± 3,04
39	(<i>E</i>)-2-nonenal	-	-	0,10 ± 0,01	-	0,09 ± 0,03	-
40	2-propilcicloexanona	-	-	1,65 ± 1,77	0,36 ± 0,37	1,70 ± 0,51	-
41	butanoato de 2-hexenila	0,15 ± 0,10	0,09 ± 0,08	-	-	-	-
42	dodecano	0,33 ± 0,26	0,22 ± 0,08	0,10 ± 0,07	0,06 ± 0,02	0,36 ± 0,36	0,14 ± 0,08
43	acetato de (<i>E</i>)-2-octenila	0,33 ± 0,14	0,10 ± 0,04	-	-	-	-
44	(<i>Z</i>)-2-decenal	-	-	-	-	0,02 ± 0,01	-
45	2,4-decadienal	-	-	-	-	0,05 ± 0,03	-
46	(<i>E</i>)-2-decenal	-	-	1,36 ± 0,32	0,90 ± 0,34	2,00 ± 0,81	1,49 ± 1,59
47	1-trideceno	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,00	-	0,06 ± 0,03	0,05 ± 0,02	-
48	trideceno - isômero 2	0,05 ± 0,04	0,02 ± 0,00	-	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	-
49	trideceno - isômero 3	0,09 ± 0,07	0,05 ± 0,00	-	-	0,09 ± 0,04	-
50	tridecano	3,40 ± 1,87	3,32 ± 1,06	2,40 ± 1,55	1,79 ± 1,18	3,66 ± 2,17	3,06 ± 0,42
51	tetradecano	-	-	-	-	0,14 ± 0,17	-
52	undecanol	-	-	-	-	0,05 ± 0,03	-
53	β-humuleno	0,13 ± 0,09	-	-	-	-	-
54	α-cariofileno	0,24 ± 0,18	0,30 ± 0,24	-	-	-	-
55	Isômero do pentadecano	-	-	-	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	-
56	pentadecano	-	-	-	0,11 ± 0,00	0,15 ± 0,08	-

Compostos não detectados (-). Foram analisados seis indivíduos de cada grupo, individualmente. Esses valores são referentes à análise após estímulo. Foram considerados os compostos com área relativa do pico cromatográfico (CG-EM) superior a 0,01%. O composto de número (21) e (34) não constam nessa tabela.

3.2.3. *Headspace* estático (SPME) dos voláteis de *Phloeophana longirostris*

Os compostos voláteis da espécie *Phloeophana longirostris* foram adsorvidos em fibra para análise de SPME (Carboxen-PDMS) e desorvidos em cromatógrafo (CG-EM). Um total de 20 indivíduos foi analisado em condições de repouso e após estímulo. Foi possível detectar, após estímulo mecânico nos insetos, 88 compostos voláteis sendo 44 exclusivos da espécie *Phloeophana longirostris*. Nenhum composto foi detectado nas análises das ninfas de 1º ínstar (em repouso e após estímulo) e nos demais estágios de desenvolvimentos com os insetos em repouso. Na análise dos compostos voláteis de *Phloeophana longirostris*, aldeídos insaturados e hidrocarbonetos foram comuns a todos os indivíduos, sendo eles o 2-metil-3-pentenal (**7**), (*Z*)-2-hexenal (**9**), (*E*)-2-hexenal (**10**), decano (**24**), (*E*)-2-octenal (**32**), 1-undeceno (**36**), undecano (**37**) e o dodecano (**42**).

O modelo de PLS-DA construído para a análise entre jovens e adultos apresentou vinte indivíduos, cinco componentes principais e variância de 71,46%. O uso desse modelo permitiu discriminar os jovens dos adultos ao longo da CP1. De acordo com a Figura 20 o padrão de distribuição dos jovens indica uma possível semelhança entre o grupo (ninfas). No entanto, a dispersão visualizada nos adultos é devido às diferenças químicas entre machos e fêmeas.

Além da diferença morfológica utilizada para classificação dos insetos, é notória a distinção dos compostos químicos entre jovens e adultos. Através do gráfico de escores Figura 21, é possível verificar quais compostos estão envolvidos nessa discriminação. Alguns compostos foram detectados exclusivamente nos jovens, como o vinilfurano (**3**), (*E*)-2-pentenal (**5**), 5-etil-2(3H)-furanona (**22**), 2-isopropilcicloexanona (**38**), (*E*)-2-nonenal (**39**), (*E*)-2-decenal (**46**), pentadecano (**56**), isômero da furanona (**59**), isômero do furano (**69**), 3-metil-1-etilciclopentano (**70**), 5-metil-4-hexen-3-ona (**77**) e o composto desconhecido **23** (Anexo 27). O composto β -pineno (**71**), foi detectado apenas nos indivíduos

adultos de *Phloeophana longirostris* e o (*E*)-2-hexen-1-ol foi comum aos adultos das duas espécies estudadas.

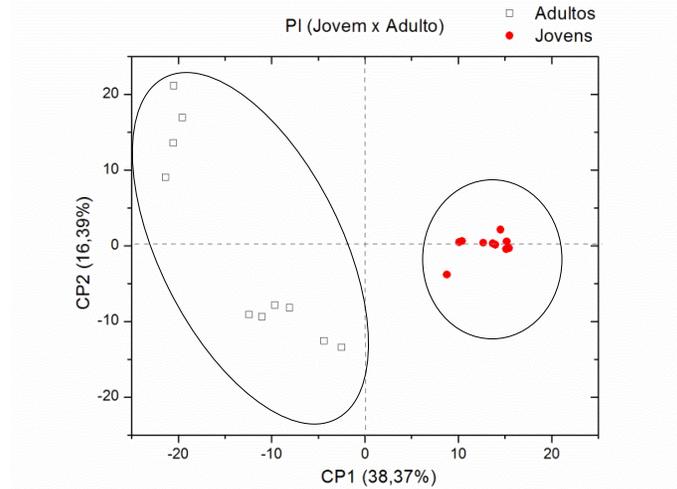


Figura 20. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (5 CP; 71,46% da variância; $R_{val} = 0,96$; $R_{cal} = 0,99$) mostrando a discriminação dos indivíduos jovens e adultos da espécie *Phloeophana longirostris* ao longo de CP1.

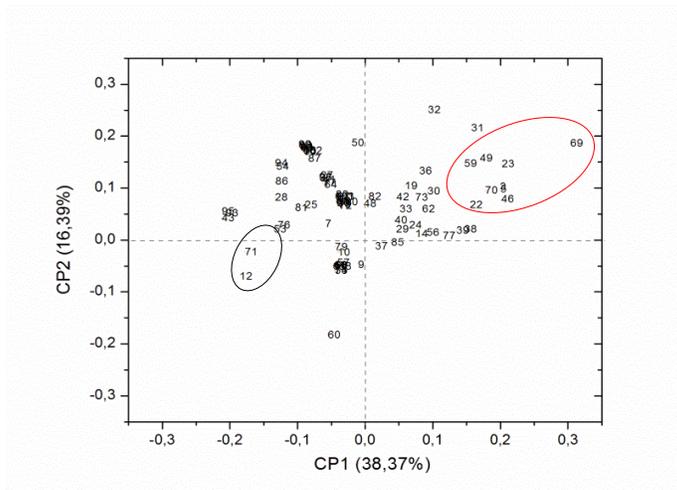


Figura 21. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 20, destacando os compostos relevantes na distinção dos indivíduos jovens e adultos da espécie *Phloeophana longirostris* (PI).

Para a separação entre os diferentes estágios de desenvolvimento juvenil (ninfas), o modelo foi construído com 10 indivíduos, apresentando quatro componentes principais e variância de 85,44%. As ninfas de 2° e 4° ínstar foram discriminadas ao longo da CP1, enquanto as ninfas de 3° ínstar, ao longo da CP2 (Figura 22, Tabela 4).

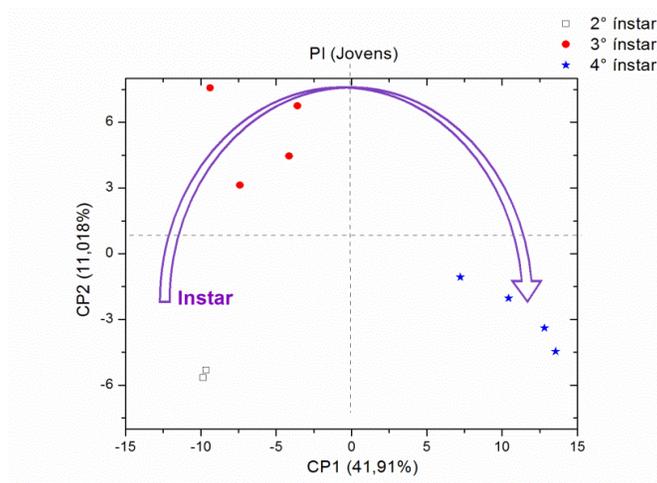


Figura 22. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (4 CP; 85,44% da variância; $R_{val} = 0,96$; $R_{cal} = 0,99$), mostrando a discriminação dos indivíduos jovens da espécie *Phloeophana longirostris* segundo os respectivos ínstares ao longo de CP1.

Os compostos responsáveis pela distinção entre os ínstares na espécie *Phloeophana longirostris*, foi o composto desconhecido **85** (Anexo 75), detectado exclusivamente nas ninfas de 2º instar, e o fenilacetato de metila (**82**). Os compostos desconhecidos **33** (Anexo 36) e **62** (Anexo 53) foram detectados exclusivamente nas ninfas de 3º instar. Para as ninfas de 4º instar, quatro compostos foram detectados o desconhecido 73 (Anexo 63), 2-propilciclohexanona (**40**), 5-etil-2(5H)-furanona (**30**) e o desconhecido **29** (Anexo 32, Figura 23, Tabela 4).

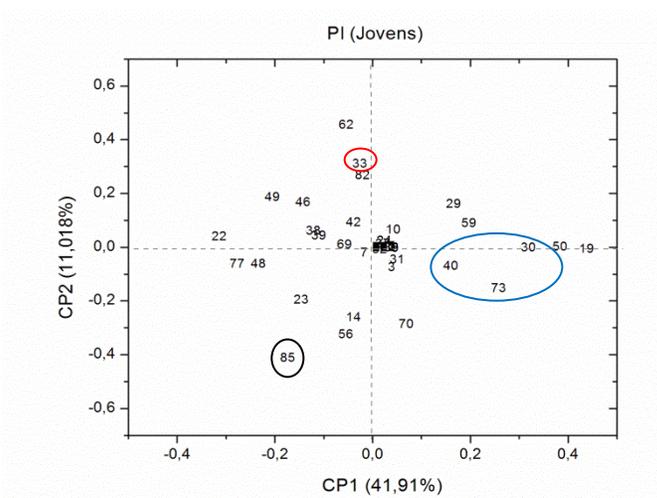


Figura 23. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 22, destacando os compostos relevantes na distinção dos indivíduos jovens de *Phloeophana longirostris*.

Os compostos (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**), (*E*)-2-octenal (**32**) e undecano (**37**), foram mais abundantes nas ninfas de *Phloeophana longirostris* (Figura 24). Resultado semelhante foi obtido para a espécie *Phloea subquadrata*.

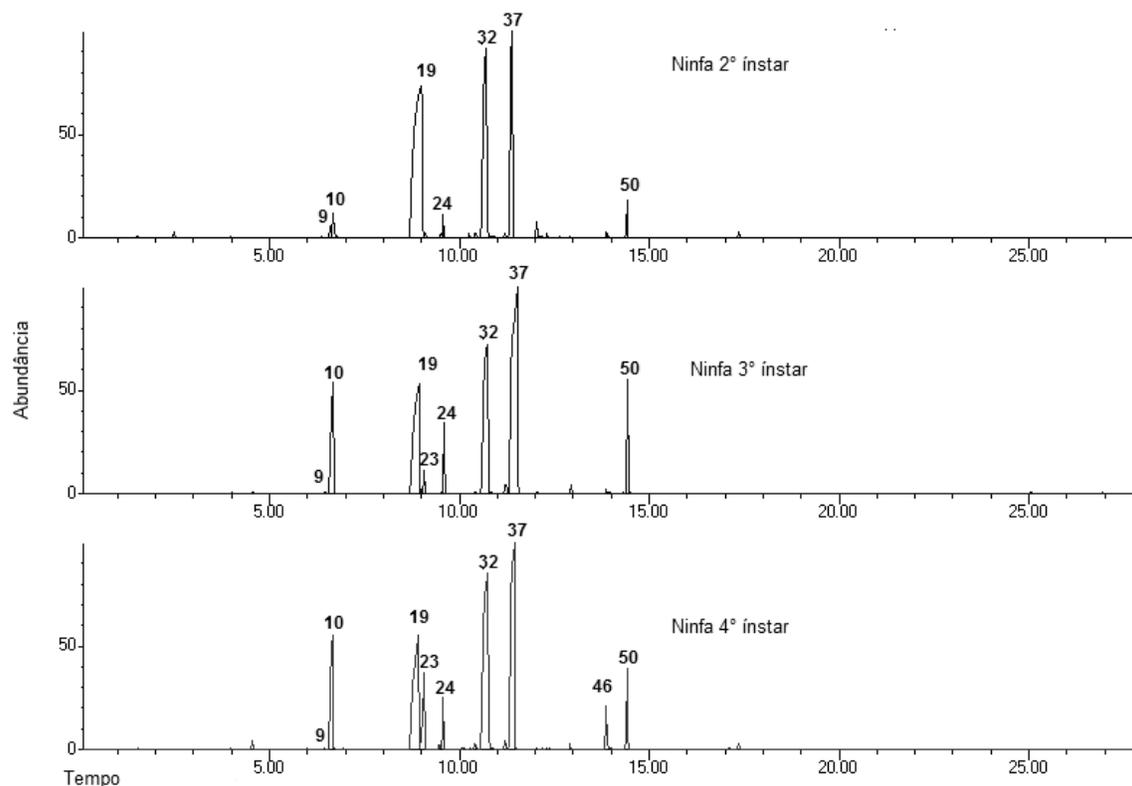


Figura 24. Cromatogramas de íons totais (CG-EM/SPME) dos voláteis de indivíduos jovens (2º ao 4º ínstars) de *Phloeophana longirostris* após estímulo. Numeração sobre os picos correspondem aos compostos da Tabela 4.

Analisando os resultados dos voláteis de *Phloeophana longirostris* (Tabela 4, Anexo 6) foi possível verificar que 10 compostos foram comuns apenas a machos e fêmeas: o (*E*)-2-hexen-1-ol (**12**), acetato de (*E*)-2-hexenila (**28**), acetato de 2-octenila (**43**), β -humuleno (**53**), β -pineno (**71**), limoneno (**76**), aldeído “lilalic” (**81**), β -elemeno (**86**), δ -selineno (**93**) e α -selineno (**95**).

Todos os sesquiterpenos detectados em ambas as espécies foram encontrados apenas nos adultos. Além disso, uma diversidade maior dessa classe de compostos foi detectada apenas nas fêmeas de *Phloeophana longirostris* (Figura 25, Tabela 3 e Tabela 4).

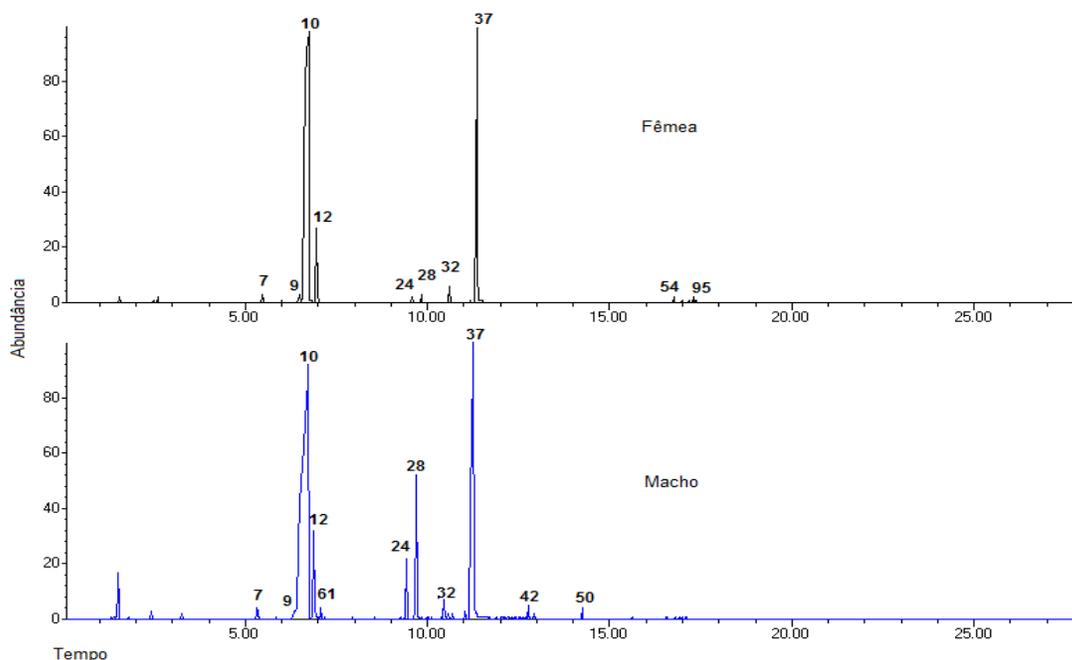


Figura 25. Cromatogramas de íons totais (CG-EM/SPME) dos voláteis de macho e fêmea de *Phloeophana longirostris*. Condição das análises: 40 °C (3 min), 10°C·min⁻¹ até 290°C. Numeração sobre os picos correspondem aos compostos da Tabela 4.

O modelo construído para discriminação entre machos e fêmeas da espécie *Phloeophana longirostris* foi composto por 12 indivíduos e apresentou duas componentes principais com variância 59,44%. O modelo foi satisfatório para separação entre machos e fêmeas ao longo de CP1 (Figura 26).

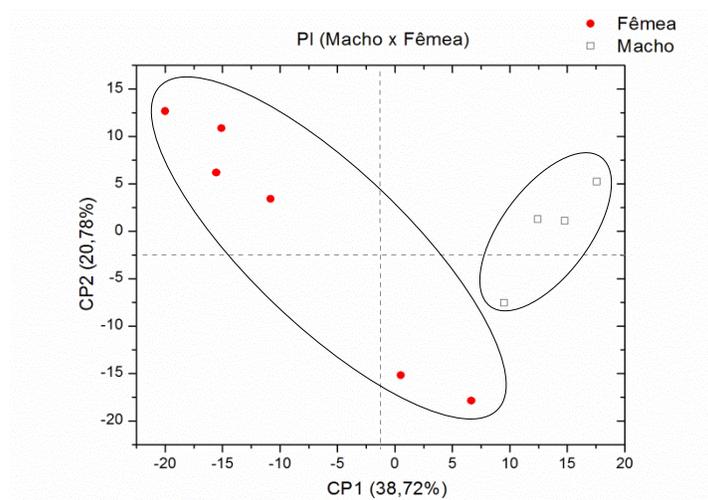


Figura 26. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (2 CP; 59,44% da variância; $R_{val} = 0,66$; $R_{cal} = 0,94$) mostrando a discriminação entre machos e fêmeas da espécie *Phloeophana longirostris* ao longo de CP1.

No geral, 34 compostos foram detectados exclusivamente nas fêmeas de *Phloeophana longirostris* destacando-se os terpenos: α -copaeno (**84**), β -gurjuneno (**89**), β -aromadendreno (**90**), α -cariofileno (**54**), α -aromadendreno (**91**), β -selineno (**94**), β -cadineno (**96**), β -germacreno (**97**), epóxido de isoaromadendreno (**98**), óxido de cedreno (**99**), epóxido de humuleno II (**100**), óxido de bisaboleno (**101**), óxido humuleno III (**102**) e o epóxido de allo-aromadendreno (**103**).

Para os machos, apenas sete compostos foram exclusivos: o 5-metil-2(3H)-furanona (**11**), acetato de 3-metil-2-butenila (**16**), acetato de 2-metilpropano (**57**), 3-metil-2-butenal (**58**), acetato de 2-metilbutenila (**61**), butanoato de 2-metilpropila (**66**) e epi-biciclosesquifelandreno (**88**) (Figura 27).

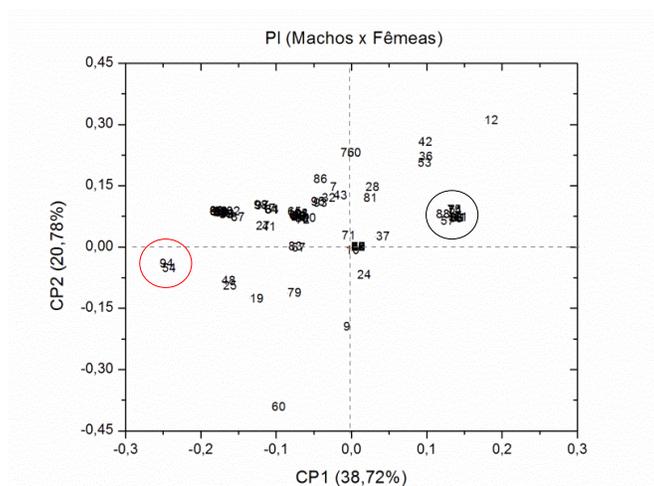


Figura 27. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 26, destacando os compostos relevantes na distinção dos indivíduos machos e fêmeas pertencentes à espécie *Phloeophana longirostris* (PI).

A presença de diversos sesquiterpenos oxidados (**98**, **99**, **100**, **101**, **102** e **103**) somente nas fêmeas é um fato marcante. O *cis* e *trans* epóxi-bisabolenos são feromônios sexuais de alguns percevejos dos gêneros de *Nezara* e *Chinavia* (Figura 28).³⁵

³⁵ Moraes, M. C.B.; *et. al.* *Neotrop. Entomol.* **2008**, 37, 5, 489-505.

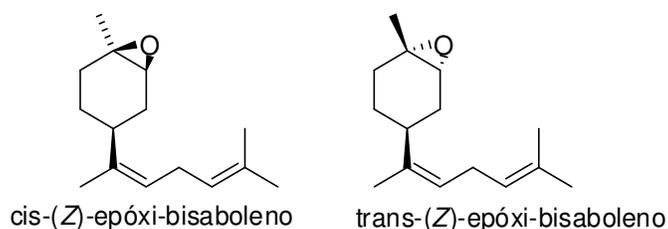


Figura 28. Feromônios sexuais de algumas espécies de percevejos.

Comparando a fragmentação do feromônio sexual Figura 28 e de **101**, verifica-se que são compostos distintos, pois a fragmentação de **101** se destaca pelos picos de m/z 93 (100%) e m/z 43 (30%) pouco intenso, enquanto, que nos feromônios de *Nezara* e *Chinavia*, ambos os fragmentos são abundantes [*cis* m/z 93 (81%) e m/z 43 (100%); *trans* m/z 93 (100%) e m/z 43 (94%)]. Estas características nos levam a sugerir que os sesquiterpenos oxidados fazem parte dos compostos envolvidos na seleção sexual de *Phloeophana longirostris*.

De maneira geral, é reportado na literatura que em percevejos os machos estejam envolvidos nas emissões dos feromônio sexuais e as fêmeas recebem esse estímulo.^{36,37} Porém, para os insetos, não existe um padrão definido de emissor e receptor dos feromônios envolvidos nos processos sexuais. Contudo, as evidências encontradas neste trabalho servirão de base para futuros bioensaios como eletroantenografia e ensaios de campo.

Este trabalho fornece as primeiras informações sobre a química dos percevejos da família Phloeidae. O padrão dos compostos de jovens e adultos podem indicar diferenças nas defesas químicas utilizadas de acordo com o estágio de desenvolvimento. Além disso, foi possível identificar compostos potenciais entre os voláteis liberados por machos e fêmeas que podem fornecer indícios para a pesquisa dos feromônios sexuais destes insetos.

³⁶ Zarbin, P. H. G.; *et. al.* *J. Chem. Ecol.* **2012**, 38, 825-835.

³⁷ Millar, J.G.; *et. al.* *IOBC wprs Bulletin.* **2002**, 25, 1-11.

Tabela 4. Abundância relativa (%) referente à média e desvio padrão da composição química dos voláteis de *Phloeophana longirostris*

Nº	Compostos e/ou m/z	Macho	Fêmea	Ninfa 2º	Ninfa 3º	Ninfa 4º
3	vinilfurano	-	-	0,09 ± 0,05	0,03 ± 0,01	0,14 ± 0,09
5	(E)-2-pental	-	-	0,06 ± 0,05	0,08 ± 0,06	0,13 ± 0,12
6	2-metilbutanoato de metila	-	0,03 ± 0,00	-	-	-
7	2-metil-3-pental	0,43 ± 0,23	0,53 ± 0,17	0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,00
9	(Z)-2-hexenal	0,97 ± 0,12	0,57 ± 0,54	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,03	0,08 ± 0,01
10	(E)-2-hexenal	48,56 ± 7,02	73,12 ± 6,58	3,97 ± 4,94	7,96 ± 5,00	8,93 ± 2,80
11	5-metil-2(3H)-furanona	0,13 ± 0,04	-	-	-	-
12	(E)-2-hexen-1-ol	2,68 ± 2,04	0,40 ± 0,22	-	-	-
14	nonano	-	-	0,01 ± 0,00	-	0,01 ± 0,00
15	2,4-hexadienal	-	0,11 ± 0,04	-	-	-
16	Acetato de 3-metil-2-butenila	0,09 ± 0,04	-	-	-	-
17	hexanoato de metila	-	0,04 ± 0,02	-	-	-
19	(E)-4-oxo-2-hexenal	-	0,19 ± 0,17	-	-	29,73 ± 7,60
20	3-metilexanoato de metila	-	0,03 ± 0,00	-	-	-
22	5-etil-2(3H)-furanona	-	-	0,33 ± 0,15	1,08 ± 0,75	-
23	desconhecido	-	-	0,49 ± 0,06	0,44 ± 0,34	0,66 ± 0,26
24	decano	1,64 ± 0,22	0,26 ± 0,13	0,70 ± 0,00	1,28 ± 0,68	1,16 ± 0,26
25	acetato de (Z)-3-hexenila	-	0,16 ± 0,19	-	-	-
27	acetato de hexila	-	0,08 ± 0,07	-	-	-
28	acetato de (E)-2-hexenila	4,14 ± 3,47	0,77 ± 0,91	-	-	-
29	desconhecido	-	-	-	-	0,12 ± 0,05
30	5-etil-2(5H)-furanona	-	-	-	-	0,13 ± 0,03

31	(<i>Z</i>)-2-octenal	-	0,02 ± 0,01	0,22 ± 0,15	0,13 ± 0,03	0,37 ± 0,09
32	(<i>E</i>)-2-octenal	1,82 ± 1,33	3,88 ± 1,91	26,75 ± 2,49	20,74 ± 1,78	24,03 ± 4,14
33	desconhecido	-	-	-	0,55 ± 0,29	-
36	1-undeceno	0,50 ± 0,23	0,10 ± 0,07	0,23 ± 0,04	0,51 ± 0,21	0,33 ± 0,12
37	undecano	32,37 ± 10,49	8,98 ± 6,32	19,07 ± 1,03	33,47 ± 7,70	27,90 ± 4,68
38	2-isopropilcicloexanona	-	-	0,60 ± 0,44	0,31 ± 0,21	0,16 ± 0,05
39	(<i>E</i>)-2-nonenal	-	-	0,17 ± 0,05	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,01
40	2-propilcicloexanona	-	-	-	-	0,07 ± 0,02
41	butanoato de 2-hexenila	-	0,03 ± 0,03	-	-	-
42	dodecano	0,38 ± 0,08	0,07 ± 0,05	0,09 ± 0,01	0,25 ± 0,12	0,13 ± 0,06
43	acetato de 2-octenila	1,43 ± 1,05	1,17 ± 0,71	-	-	-
46	(<i>E</i>)-2-decenal	-	-	0,67 ± 0,21	0,33 ± 0,32	1,27 ± 0,86
48	trideceno (isômero 2)	-	0,11 ± 0,08	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,02	-
49	trideceno (isômero 3)	-	0,03 ± 0,01	1,53 ± 0,42	3,63 ± 2,09	0,05 ± 0,01
50	tridecano	0,76 ± 0,57	1,35 ± 0,81	-	-	2,47 ± 0,74
51	tetradecano	0,08 ± 0,01	-	-	-	-
53	β-humuleno	0,27 ± 0,19	0,03 ± 0,01	-	-	-
54	α-cariofileno	-	0,89 ± 0,44	-	-	-
56	pentadecano	-	-	0,09 ± 0,03	-	0,12 ± 0,02
57	acetato de 2-metilpropano	0,04 ± 0,03	-	-	-	-
58	3-metil-2-butenal	0,10 ± 0,08	-	-	-	-
59	isômero da furanona	-	-	-	0,40 ± 0,33	0,42 ± 0,32
60	isômero do hexenol	-	2,77 ± 2,99	-	-	-
61	acetato de 2-metilbutenila	0,22 ± 0,18	-	-	-	-

62	desconhecido	-	-	-	0,04 ± 0,02	-
63	3-etil-2,4-pentadien-1-ol	-	0,05 ± 0,00	-	-	-
64	2-etil-2-pentenal	-	0,02 ± 0,01	-	-	-
65	2-propenoato de pentila	-	0,11 ± 0,13	-	-	-
66	butanoato de 2-metilpropila	0,10 ± 0,02	-	-	-	-
67	(<i>E</i>)-2-heptenal	-	0,03 ± 0,01	-	-	-
68	benzaldeido	-	0,12 ± 0,03	-	-	-
69	derivado do furano	-	-	44,53 ± 3,18	29,31 ± 7,22	2,53 ± 2,42
70	3-metil-1-etilciclopentano	-	-	0,07 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,13 ± 0,03
71	β-pineno	0,11 ± 0,04	0,06 ± 0,03	-	-	-
72	butanoato de butila	-	0,01 ± 0,01	-	-	-
73	desconhecido	-	-	-	-	0,32 ± 0,04
74	isômero do decano	0,10 ± 0,08	-	-	-	-
75	2-metil-5-(2-metil-2-propenila)-cicloexanol	0,07 ± 0,01	-	-	-	-
76	limoneno	0,46 ± 0,54	0,02 ± 0,01	-	-	-
77	5-metil-4-hexen-3-ona	-	-	0,24 ± 0,07	0,08 ± 0,05	-
78	3-oxiranil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptano	-	0,02 ± 0,00	-	-	-
79	desconhecido	-	0,08 ± 0,05	-	-	-
80	éster metílico do ácido benzóico	-	0,24 ± 0,18	-	-	-
81	aldeído "lilalic"	0,09 ± 0,05	0,02 ± 0,01	-	-	-
82	fenilacetato de metila	-	0,01 ± 0,01	-	0,11 ± 0,13	-
83	desconhecido	-	0,07 ± 0,07	-	-	-
84	α-copaeno	-	0,19 ± 0,05	-	-	-
85	desconhecido	-	-	0,01 ± 0,00	-	-

86	β -elemeno	0,04 \pm 0,00	0,09 \pm 0,04	-	-	-
87	α -gurjuneno	-	0,03 \pm 0,01	-	-	-
88	epi-biciclosesquifelandreno	0,01 \pm 0,00	-	-	-	-
89	β -gurjuneno	-	0,30 \pm 0,11	-	-	-
90	β -aromadendreno	-	0,10 \pm 0,33	-	-	-
91	α -aromadendreno	-	0,20 \pm 0,07	-	-	-
92	desconhecido	-	0,30 \pm 0,12	-	-	-
93	δ -selineno	0,26 \pm 0,19	1,34 \pm 0,67	-	-	-
94	β -selineno	-	1,26 \pm 0,80	-	-	-
95	α -selineno	0,37 \pm 0,26	2,34 \pm 1,33	-	-	-
96	β -cadineno	-	0,24 \pm 0,08	-	-	-
97	β -germacreno	-	0,10 \pm 0,08	-	-	-
98	epóxido de isoaromadendreno	-	0,12 \pm 0,10	-	-	-
99	óxido de cedreno	-	0,02 \pm 0,01	-	-	-
100	epóxido de humuleno II	-	0,02 \pm 0,02	-	-	-
101	óxido de bisaboleno	-	0,07 \pm 0,02	-	-	-
102	óxido humuleno III	-	0,19 \pm 0,19	-	-	-
103	epóxido de allo-aromadendreno	-	0,08 \pm 0,03	-	-	-

Compostos não detectados (-). Foram analisados seis indivíduos de cada grupo, individualmente, em situação de estímulo, totalizando 20 indivíduos (quatro machos, seis fêmeas, duas ninfas 2° ínstar, quatro ninfas 3° ínstar e quatro ninfas 4° ínstar). Foram considerados para a análise os compostos com área relativa do pico cromatográfico (CG-EM) superior a 0,01%. A sequência numérica que antecede o nome na tabela (Tabela 4) não é contínua, visto que, nem todos os compostos detectados para a espécie *Phloea subquadrata* (1 ao 56), foram detectados na espécie *Phloeophana longirostris*. Todos os compostos de numeração (57) a (103), foram detectados exclusivamente na espécie *Phloeophana longirostris*.

3.2.4. Voláteis de *Phloea subquadrata* versus *Phloeophana longirostris*

Para facilitar a comparação entre as espécies de *Phloeophana longirostris* e *Phloea subquadrata* a matriz de dados foi construída com 52 indivíduos (20 da espécie *Phloeophana longirostris* e 32 da *Phloea subquadrata*). Foram detectados 100 compostos (variáveis) por CG-EM/SPME, destes 44 são exclusivos da espécie *Phloeophana longirostris*, 12 da espécie *Phloea subquadrata* e 44 compostos comuns a ambas. Diversos modelos de PLS-DA foram então construídos, de maneira a explorar diferenças dentro dos grupos (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo dos modelos de PLS-DA

Amostras	CP	%Variância	R _{val}	R _{cal}	n _{amost} GP1	n _{Erro} GP1	n _{amost} GP2	n _{Erro} GP2	n _{amost} GP3	n _{Erro} GP3	n _{variáveis}
PI x Os	4	48,04	0,8972	0,9671	20	2	32	1	-	-	100
PI&PsJovens											
x Adultos	4	47,23	0,9501	0,9837	22	0	30	1	-	-	100
PI&Ps											
Machos x	5	66,74	0,7578	0,9902	10	1	12	1	-	-	100
Fêmeas											

CP: número de componentes principais; %Variância: quantidade de variância explicada pelo modelo; R_{val}: coeficiente de correlação para validação; R_{cal}: coeficiente de correlação para calibração; n_{amost} GP: número de amostras no grupo; n_{Erro}: número de erros observados pelo processo de validação cruzada (“*leave-one-out cross-validation*”) para o grupo; n_{variáveis}: número de variáveis incluídas no modelo; PI: *Phloeophana longirostris*; Ps: *Phloea subquadrata*. Os números 2º, 3º e 4º referem-se os ínstares analisados.

A espécie *Phloeophana longirostris*, apesar de ter um número menor de indivíduos analisados, em relação à espécie *Phloea subquadrata*, apresentou uma maior diversidade de compostos.

O modelo construído para a análise de PLS-DA entre as duas espécies foi composto por quatro componentes principais, apresentando 48,04% de variância explicada pelo modelo. O gráfico de escores (Figura 29) apresenta a distribuição dos compostos em CP2, mostrando que o modelo foi satisfatório, para a

discriminação das duas espécies (*Phloea subquadrata* e *Phloeophana longirostris*) analisadas.

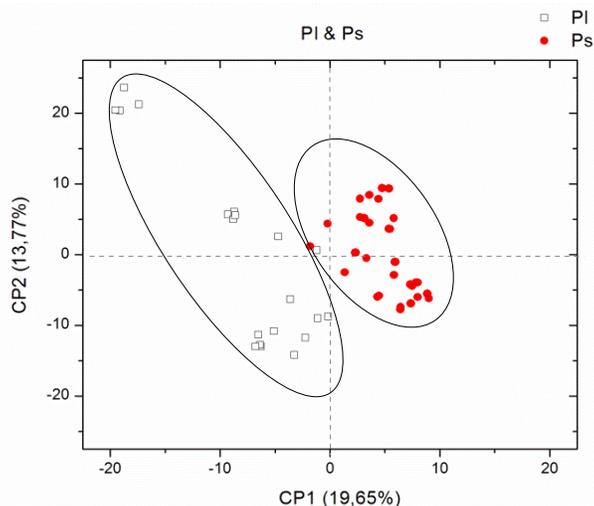


Figura 29. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (4 CP; 48,04% da variância; $R_{val} = 0,89$; $R_{cal} = 0,96$) mostrando a discriminação entre indivíduos pertencentes às espécies *Phloea subquadrata* (Ps) e *Phloeophana longirostris* (PI) ao longo de CP1.

Foi possível destacar 13 compostos responsáveis pela separação dos compostos em dois grupos distintos. O 2-metil-3-pentenal (**7**), apesar de comum as duas espécies estudadas, é responsável pela discriminação da espécie *Phloeophana longirostris*, juntamente com o β -pineno (**71**), epóxido de isoaromadendreno (**98**), isômero da furanona (**59**), 3-metil-1etilciclopentano (**70**) e o derivado do furano (**69**).

Para a espécie *Phloea subquadrata*, a 3-hepten-2-ona (**18**) e o trideceno (**47**) foram os únicos compostos detectados apenas nesta espécie. No entanto, o 5-metil-2(3H)-furanona (**11**), o composto não identificado **23**, (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**), 5-etil-2(5H)-furanona (**30**) e o tridecano (**50**), foram relevantes para a discriminação desse grupo (Figura 30).

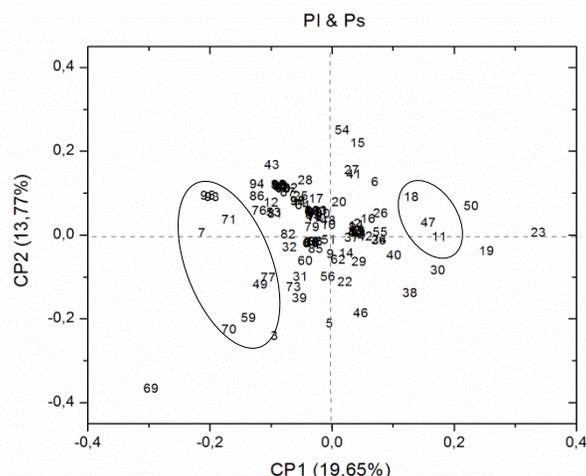


Figura 30. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 29, destacando os compostos relevantes na distinção dos indivíduos da espécie *Phloeophana longirostris* (PI) e *Phloea subquadrata* (Ps).

O modelo construído para a análise entre jovens e adultos das duas diferentes espécies apresentou quatro componentes principais com um percentual de variância de 47,23% (Tabela 5). Foram utilizados 22 indivíduos da espécie *Phloeophana longirostris* e 30 da espécie *Phloea subquadrata*.

Ao longo da CP1 é possível verificar que o modelo discriminou os indivíduos jovens e adultos mesmo analisando as duas espécies juntas. Ao longo da CP2 já foi possível verificar a distribuição dos adultos de *Phloeophana longirostris* no quadrante superior à esquerda os adultos de *Phloea subquadrata* no quadrante inferior à esquerda.

A análise dos indivíduos jovens apresentou um padrão homogêneo na distribuição dos compostos. Esse fato pode ser explicado pela semelhança entre os compostos produzidos por esses indivíduos independente da espécie. A separação bem definida dos jovens e adultos entre as duas espécies, demonstra a presença de moléculas que podem ser consideradas biomarcadores do estágio de desenvolvimento desses percevejos (Figura 31).

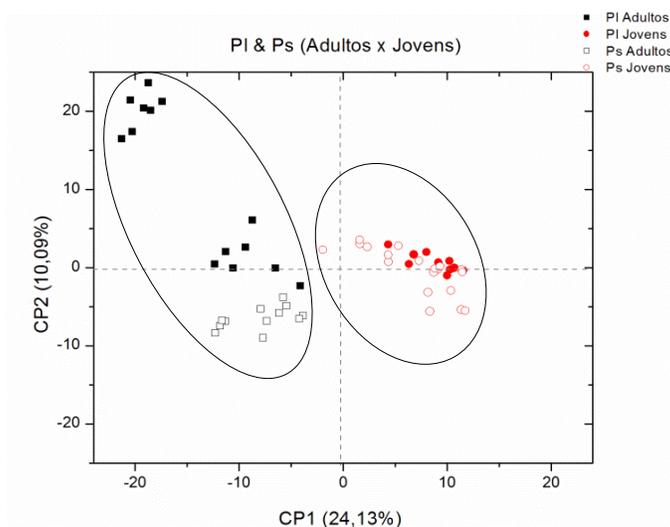


Figura 31. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (4 CP; 47,23% da variância; $R_{val} = 0,95$; $R_{cal} = 0,98$) mostrando a discriminação entre indivíduos jovens e adultos pertencentes às espécies *Phloea subquadrata* (Ps) e *Phloeophana longirostris* (Pl) ao longo de CP1 e PC2.

Os compostos envolvidos na discriminação dos indivíduos adultos, independente da espécie, ao longo da CP1 foram o 2-metilbutanoato de metila (**6**), 3-hepten-2-ona (**18**), acetato de (*E*)-2-hexenila (**28**), butanoato de 2-hexenila (**41**), dodecano (**42**) e β -pineno (**71**). No entanto, os compostos 5-etil-2(3H)-furanona (**22**), (*Z*)-2-octenal (**31**), (*E*)-2-octenal (**32**), 3-metil-1-etil-ciclopentano (**70**) foram responsáveis pela separação dos indivíduos jovens (Figura 32).

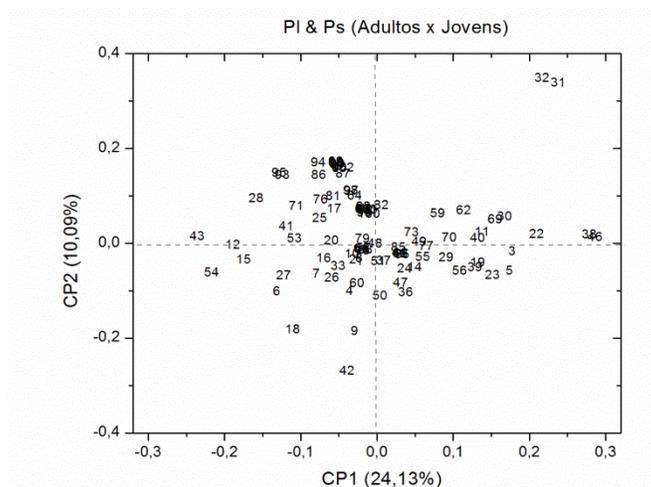


Figura 32. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 31 destacando os compostos relevantes na distinção dos indivíduos jovens e adultos da espécie *Phloeophana longirostris* (Pl) e *Phloea subquadrata* (Ps).

A análise de PLS-DA entre os indivíduos adultos das duas espécies foi realizada com cinco componentes principais, com uma variância de 66,74% explicada pelo modelo. Foram utilizados 10 indivíduos de *Phloeophana longirostris* e 12 de *Phloea subquadrata* (Tabela 5). O resultado foi a distribuição dos gêneros ao longo da CP1, onde nos quadrantes à esquerda estão distribuídas as fêmeas e à direita os machos (Figura 33).

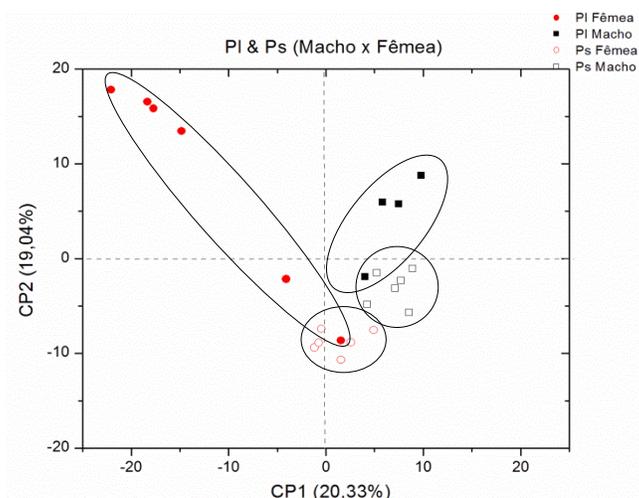


Figura 33. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (5 CP; 66,74% da variância; $R_{val} = 0,75$; $R_{cal} = 0,99$) mostrando a discriminação entre machos e fêmeas pertencentes às espécies *Phloea subquadrata* (Ps) e *Phloeophana longirostris* (Pl) ao longo de CP1.

Foi possível verificar uma separação maior dos grupos (macho e fêmea) na espécie *Phloeophana longirostris* em relação à espécie *Phloea subquadrata*, sendo que as fêmeas de *Phloeophana longirostris* apresentaram um padrão mais disperso dos demais grupos devido à presença dos sesquiterpenos.

Os compostos responsáveis pelo agrupamento das fêmeas ao longo da CP1 foram: 3-metilexanoato de metila (**20**), acetato de hexila (**27**), α -cariofileno (**54**) e β -selineno (**94**). Dentre esses compostos somente o **94** foi detectado exclusivamente na espécie *Phloeophana longirostris*. Os demais foram comuns a ambas as espécies. Para os machos foi possível destacar dois compostos, 5-etil-2(5H)-furanona (**30**) e o β -humuleno (**53**) (Figura 34). Todos os compostos presentes nos machos foram detectados nas duas espécies de percevejos estudadas.

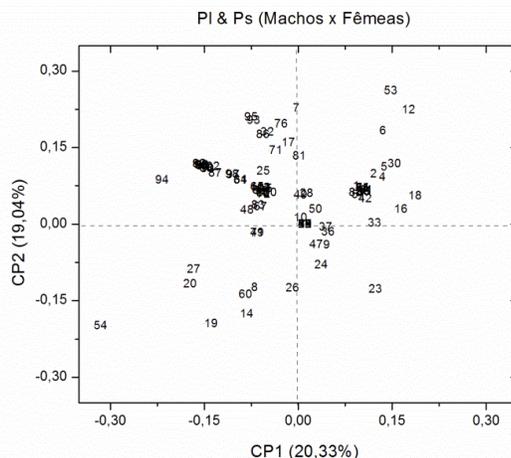


Figura 34. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA da Figura 33 destacando os compostos relevantes na distinção entre machos e fêmeas das espécies *Phloeophana longirostris* (PI) e *Phloeoa subquadrata* (Ps).

A análise de PLS-DA, entre os indivíduos jovens das duas espécies, considerou três componentes principais. Conforme gráfico e tabela (Anexo 1, Anexo 2 e Anexo 3), a distribuição dos ínstares não seguiu um padrão em apenas duas dimensões. No entanto, na análise por espécie, foi possível verificar a tendência de separação de acordo com os diferentes estágios de desenvolvimentos analisados.

3.3. Identificação e Caracterização dos Compostos do Conteúdo das Glândulas

Os compostos até aqui identificados foram coletados na fase gasosa (*headspace*) e caracterizados por espectrometria de massas. Portanto, salvo os compostos com padrão sintético, ficava a dúvida da estereoquímica e posições das insaturações dos compostos majoritários.

Adicionalmente, o fato de coletar os compostos na fase gasosa, não permitiu determinar a glândula emissora. Assim foi proposto analisar o conteúdo das glândulas de jovens e adultos e identificar as glândulas responsáveis pelo armazenamento das secreções.

3.3.1. Identificação do conteúdo das glândulas

A análise do conteúdo das glândulas metatorácicas dos adultos de *Phloea subquadrata* foi realizada através da dissecação do inseto seguida da retirada do líquido glandular com auxílio de uma microseringa.³⁸ As primeiras análises foram realizadas por CG-EM sem adição de solvente para diluição da amostra. Desta maneira, foi possível verificar a variedade de compostos presentes na glândula metatorácica dos adultos, sendo os mais abundantes o (*E*)-2-hexenal (**10**), (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**), decano (**24**), acetato de (*E*)-2-hexenila (**28**), undecano (**37**), butanoato de 2-hexenila (**41**), dodecano (**42**), acetato de 2-octenila (**43**), tridecano (**50**), α -cariofileno (**54**) e o óxido humuleno III (**102**) (Figura 40, Figura 35).

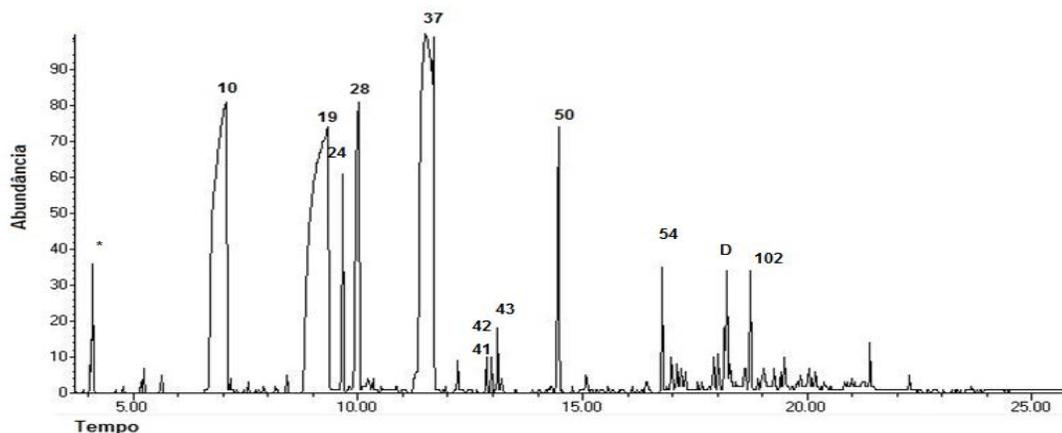


Figura 35. Cromatograma de íons totais (CG-EM) do conteúdo glandular de macho *Phloea subquadrata* na ausência de solventes. Condição de análise: 40 °C (3 min)-290 °C (10 °C·min⁻¹). (*) solvente. D: composto desconhecido. Numeração dos picos cromatográficos conforme Figura 40.

Após a diluição do conteúdo glandular (acetato de etila bidestilado), a maior parte dos compostos, que estavam em baixa abundância, não foram mais detectados (Figura 36). A estratégia de concentrar a mistura em fluxo de gás inerte não é eficiente devido à volatilidade dos compostos.

³⁸ Dissecação foi realizada no IQ-UNICAMP pela Msc. Adriana T. Salomão (IB-UNICAMP).

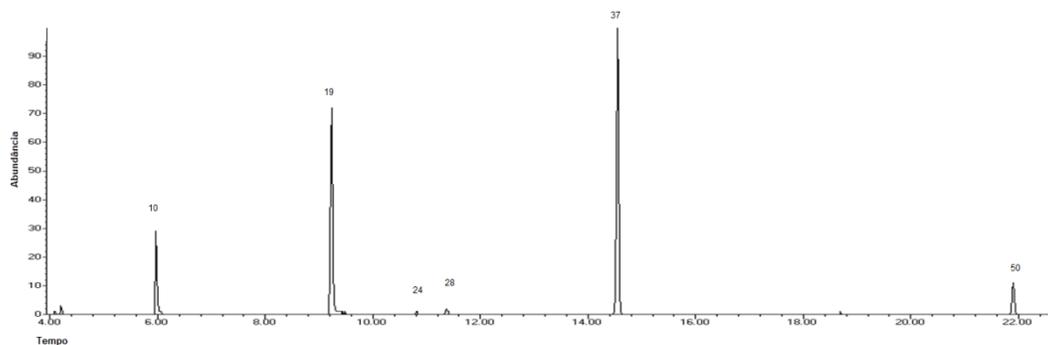


Figura 36. Cromatograma de íons totais obtidos através da análise (CG-EM) do conteúdo glandular de macho *Phloea subquadrata* diluído em acetato de etila. Condições de análise: 40 °C-290 °C (10 °C·min⁻¹). Numeração dos picos cromatográficos conforme Figura 40.

A identificação dos compostos glandulares dos indivíduos jovens de *Phloea subquadrata* foi através das exúvias,³⁹ as quais permanecem aderidas ao exoesqueleto do inseto após a ecdise (muda), mantendo o conteúdo glandular (Figura 37).



Figura 37. Exúvias de 4º instar da espécie *Phloea subquadrata*. (Foto: Francine S.A. Fonseca)

O uso de exúvias foi uma estratégia interessante, pois além de evitar o sacrifício de animais dificulta a contaminação com outras biomoléculas. No cromatograma desta análise foi possível detectar o (*E*)-2-hexenal (**10**), (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**), (*E*)-2-octenal (**32**) e o undecano (**37**) como compostos majoritários (Figura 38). Esses compostos também foram detectados nas análises do extrato corpóreo, dos voláteis dessa espécie e da espécie *Phloeophana longirostris*.

Além desses compostos, foram encontrados nas amostras de exúvias três (**A**, **B** e **C**, Anexo 94) dos quatro possíveis dímeros do composto (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**) (*m/z* 112), que também foram detectados nas glândulas de adultos e no extrato total das ninfas dos indivíduos de *Phloea subquadrata*.

³⁹ Exoesqueleto quitinoso deixado após a mudança de um ínstar.

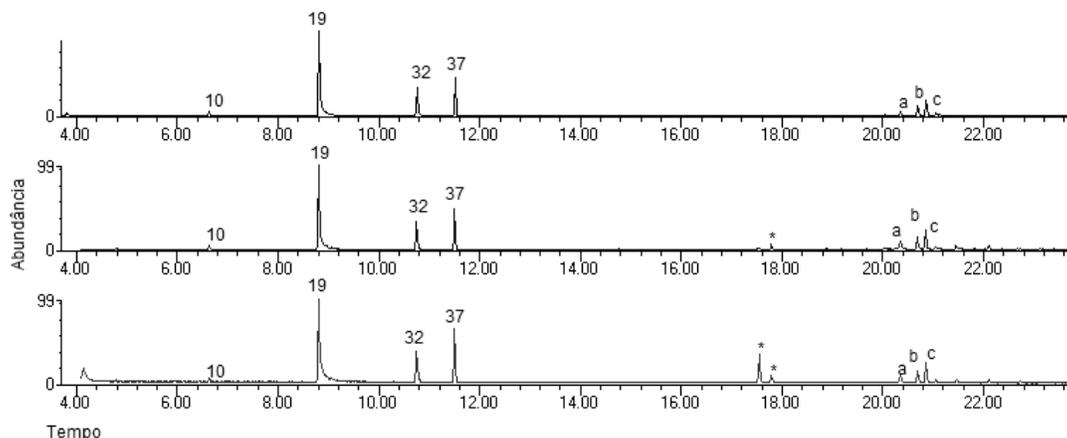


Figura 38. Cromatograma de íons totais (CG-EM) de exúvias de 4° ínstar de *Phloea subquadrata*. Condições de análise: 40°C (3 min)-290°C (10 °C·min⁻¹). Numeração dos picos cromatográficos conforme Figura 40. (*) produtos de decomposição da coluna cromatográfica.

A análise do conteúdo glandular pelo método de compressão da parte ventral do inseto não foi eficiente, pois revelou uma baixa abundância e variedade de compostos quando comparada às técnicas de retirada direta com microseringa e uso exúvias. A tentativa de utilizar essa técnica foi, principalmente, pela dificuldade de encontrar exúvias frescas no campo. De acordo com o cromatograma obtido (Figura 39) os compostos (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**) e (*E*)-2-octenal (**32**) foram predominantes na ninfa de 5° ínstar.

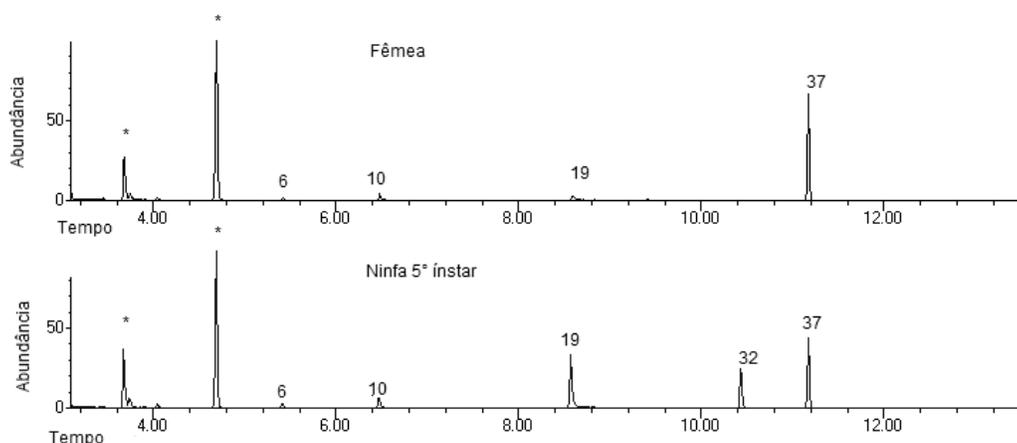


Figura 39. Cromatograma de íons totais (CG-EM) de exúvias de *Phloea subquadrata*. Condições de análise: 40°C (3 min)-290°C (10 °C·min⁻¹). Numeração dos picos cromatográficos conforme Figura 40. (*) contaminantes do solvente.

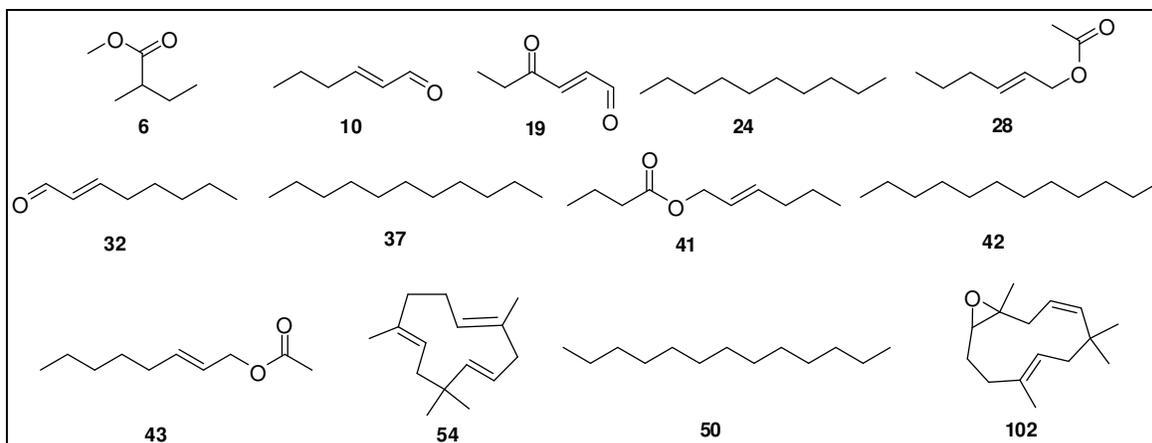


Figura 40. Compostos majoritários presentes nas glândulas de *Phloea subquadrata* e *Phloeophana longirostris*.

3.3.2. Caracterização química do conteúdo glandular

A estereoquímica dos compostos (*E*)-2-hexenal (**10**) e (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**) de *Phloea subquadrata* foram determinadas pelas constantes de acoplamento entre H-2 e H-3 de **10** ($J=15,7$ Hz) e H-2 e H-3 de **19** ($J=16,4$ Hz) obtidas nas análises de RMN de ^1H e característicos de hidrogênios olefínicos com configuração (*E*).⁴⁰ Esses compostos foram retirados diretamente da glândula metatorácica de machos para análise (Figura 41, Tabela 6).

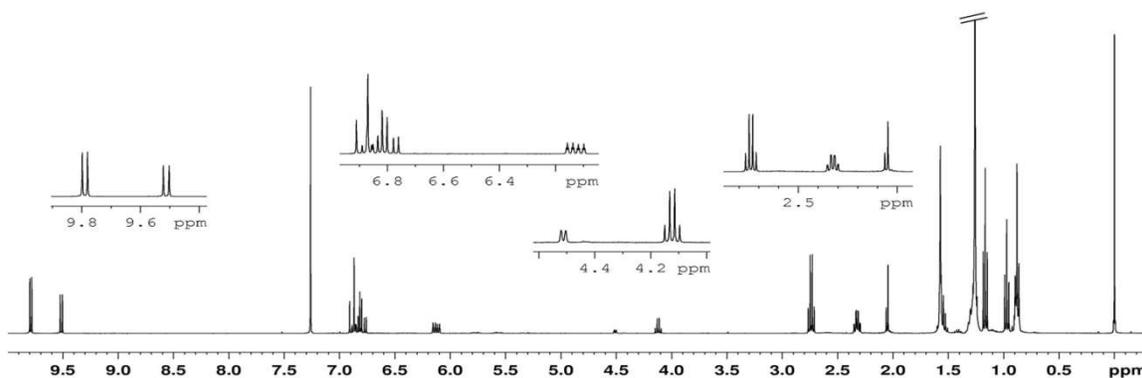


Figura 41. Espectro de RMN de ^1H (400,00 MHz, CDCl_3 , TMS) da misturas dos compostos (undecano, (*E*)-2-hexenal, (*E*)-4-oxo-2-hexenal), retirados diretamente da glândula de macho de *Phloea subquadrata*.

⁴⁰ Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 1991.

Por se tratar de uma mistura de compostos a análise de RMN de ^{13}C , auxiliou juntamente com as demais análises (CG-EM) na identificação dos compostos (Figura 42, Tabela 6, Anexo 100 e Anexo 101).

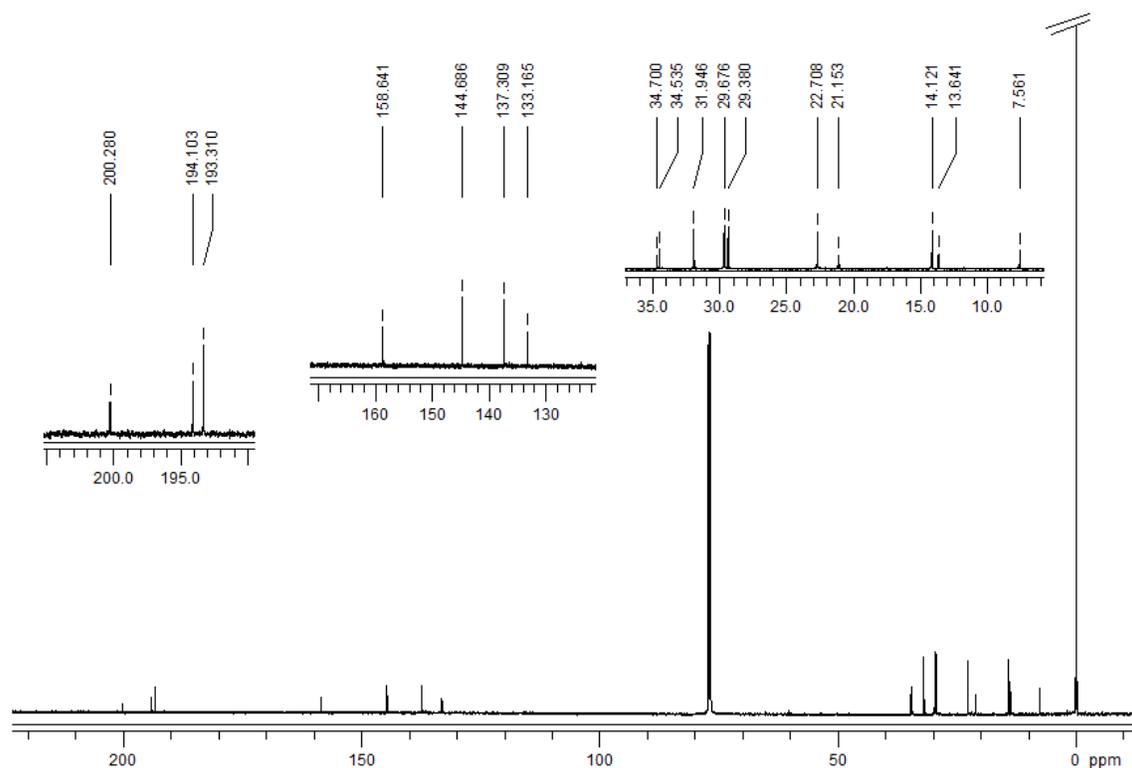
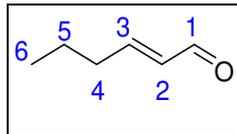
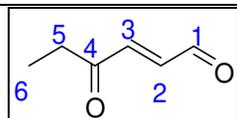


Figura 42. Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) da secreção da glândula de macho de *Phloea subquadrata*. Processamento realizado no programa *MestRec*.

Tabela 6. Atribuições dos deslocamentos químicos de RMN dos compostos (*E*)-2-hexenal (**10**) e (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**) retirados da glândula de macho *Phloea subquadrata*.



(<i>E</i>)-2-hexenal (10)		
N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)
1	193,3	9,51 (<i>d</i> , 1H, $J=7,9$ Hz)
2	133,2	6,13 (<i>ddt</i> , 1H, $J=15,7$ Hz, $J=7,9$ Hz, $J=1,5$ Hz)
3	158,6	6,85 (<i>dt</i> , 1H, $J=6,8$ Hz, $J=15,7$)
4	34,5	2,32 (<i>m</i> , 2H)
5	29,4	1,55 (<i>m</i> , 2H)
6	14,1	0,97 (<i>t</i> , 3H, $J=7,4$ Hz)



(<i>E</i>)-4-oxo-2-hexenal (19)		
N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)
1	193,1	9,78 (<i>d</i> , 1H, $J=7,2$ Hz)
2	137,7	6,79 (<i>dd</i> , 1H, $J=16,4$ Hz e $J=7,2$ Hz)
3	144,3	6,88 (<i>d</i> , 1H, $J=16,4$ Hz)
4	200,3	-
5	34,7	2,74 (<i>q</i> , 2H, $J=7,2$ Hz)
6	7,5	1,17 (<i>t</i> , 3H, $J=7,2$ Hz)

A caracterização dos compostos majoritários, por RMN de ^1H e ^{13}C , presentes no conteúdo glandular das fêmeas e jovens das espécies *Phloea subquadrata* e *Phloeophana longirostris* foi através da maceração total do inseto com solvente deuterado. Nos extratos das fêmeas foi caracterizado o composto (*E*)-2-hexenal (**10**), também presente nos machos, e o acetato de (*E*)-2-hexenila (**28**) (Anexo 102 e Anexo 103). Em relação aos jovens, foi possível caracterizar o (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**) e o (*E*)-2-octenal (**32**) (Anexo 106 e Anexo 107). Em todos os indivíduos analisados foi possível identificar os hidrocarbonetos saturados decano (**24**) e o undecano (**37**).

De maneira geral, uma das maiores características dos membros da família dos pentatomídeos é a capacidade de liberar compostos punjentes. Nos jovens essas secreções são armazenadas em glândulas dorso-abdominal e nos adultos, nas glândulas metatorácicas. O conteúdo glandular de todos os indivíduos analisados de *Phloea subquadrata* e *Phloeophana longirostris* é constituído por um sistema bifásico, assim como relatado para a maior parte dos percevejos.⁴¹

O hidrocarboneto saturado undecano (**37**), constitui o composto majoritário das glândulas dos adultos (60% abundância relativa) e os aldeídos insaturados (**10**) e (**32**), juntamente com acetatos (**28**) e outros compostos funcionalizados compõe a porção mais polar da glândula metatorácica (40%) em adultos de ambas as espécies estudadas.^{42,43} Outra característica relevante é a presença de um pigmento laranja intenso no tecido que reveste a glândula metatorácica dos adultos das espécies *Phloea subquadrata* e *Phloeophana longirostris*. É reportado na literatura, para outras espécies de pentatomídeos, que a presença desse pigmento no reservatório glandular, permite o armazenamento de produtos químicos agressivos, sem causar a auto-intoxicação.^{44,45}

A função dos compostos detectados nas glândulas para as duas espécies de percevejos estudadas nesse trabalho, ainda não é conhecida. Porém, para a maior parte dos compostos identificados, existem relatos da importância destas

⁴¹ Blum, M. S.; Traynham, J. G. *Science*. **1960**, 132, 1480-1481.

⁴² MacLeod, J.K.; et. al. *J. Insect Physiol.* **1975**, 21, 1219-1224.

⁴³ Remold, H. *Nature*. 1963, **198**, 488.

⁴⁴ Waterhouse, D.F.; Gilby, A.R. *J. Insect Physiol.* **1964**, 10, 6, 977-987.

⁴⁵ Staddon, B.W. *Advances Insect Physiol.* **1979**, 14, 351-418.

moléculas para outras espécies. Pouco é conhecido sobre a biossíntese dos precursores das moléculas funcionalizadas presentes nas glândulas dos percevejos. Alguns trabalhos relatam que grande parte dos constituintes glandulares é sintetizada pelos insetos.^{46,47} No entanto, é possível também a incorporação e concentração de compostos retirados da seiva de plantas. Estes compostos podem atuar como precursores biossintéticos e na defesa intra e inter-específica.⁴⁸

3.4. Análises dos Voláteis das Plantas

As análises dos voláteis presentes no percevejo *Phloea subquadrata*, revelaram uma variedade de compostos que são normalmente encontrados em plantas. Com isso, buscamos investigar se as plantas que os insetos utilizam como abrigo e alimento apresentam estes compostos.

As espécies de plantas, classificadas como hospedeira da espécie *Phloea subquadrata* e utilizadas neste trabalho foram: *Eugênia* sp., *Eugênia acutata*, *Eugênia blastantha*, *Eugênia neoverrucosa*, *Myrciaria floribunda* var. “vermelha” e *Myrciaria floribunda* var. “branca” (Figura 43).¹⁴



Figura 43. Caules de espécies de Myrtaceae hospedeiras de *Phloea subquadrata* na Serra do Japi, Jundiá, SP. A: *Myrciaria floribunda* var. “vermelha”; B: *M. floribunda* var. “branca”; C: *Eugenia blastantha*; D: *Eugenia* sp.; E: *E. acutata*.; F: *E. neoverrucosa*.(Fotos: Adriana T. Salomão)

⁴⁶ Blum, M.S. *Ann. Rev. Entomol.* **1987**, 32, 381.

⁴⁷ Gordon, H.T.; *et al.* *Nature.* **1963**, 197, 23.

⁴⁸ Duffey, S. S. *Ann. Rev. Entomol.* **1980**, 25, 447-77.

Além das plantas analisadas, foram coletadas na mesma área de reserva e na mesma época do ano, quatro espécies de plantas (*Eugênia pyriformes*, *Vitex* sp., *Ciclobium* sp. e *Ceiba speciosa*). Essas plantas foram coletadas por serem consideradas não hospedeiras para o percevejo *Phloea subquadrata*.⁴⁹

A análise por CG-EM/SPME dos voláteis dos caules das plantas revelaram um padrão de compostos diferentes para as espécies de plantas que os insetos utilizam como abrigo e alimento em relação às plantas não hospedeiras (Figura 44).⁵⁰

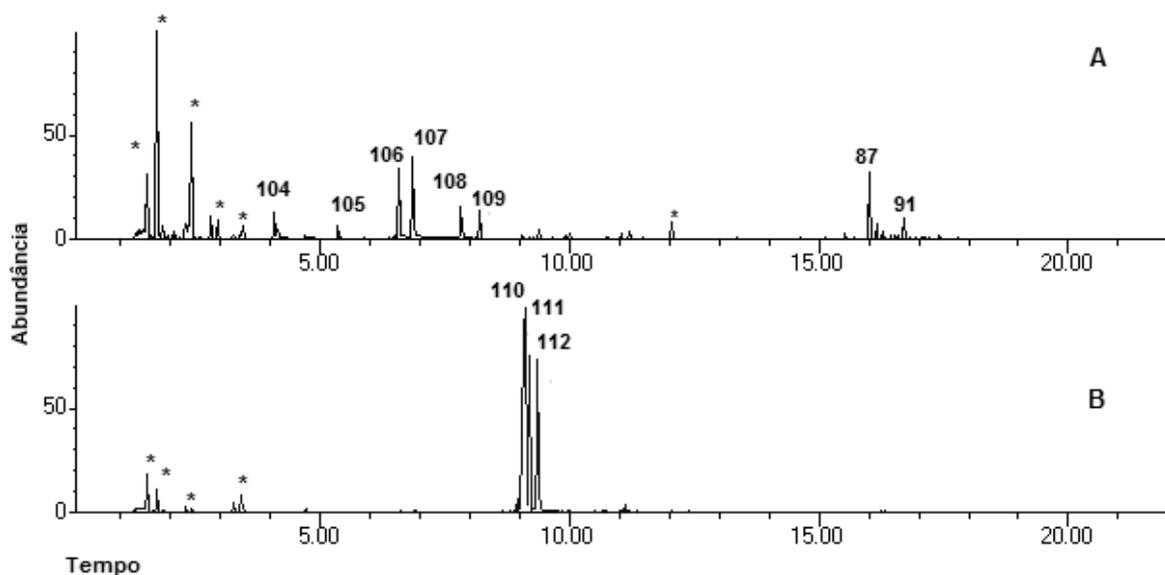


Figura 44. Cromatograma de íons totais (CG-EM/SPME) referente à análise dos voláteis das plantas através da técnica de SPME. **A:** planta hospedeira (*Eugenia acutata*). **B:** planta não hospedeira (*Ciclobium* sp.). Condição de análise: 40 °C (3 min), seguida de 10 °C·min⁻¹ até 290 °C.

Na análise dos voláteis da planta hospedeira (*Eugenia acutata*) foi detectada uma variedade de compostos, dentre eles destacam-se o 3-metil-1-butanol (**104**), hexanal (**105**), 3-hexenol (**106**), hexanol (**107**), metoxibenzeno (**108**) e o pineno (**109**). Na análise da espécie (*Ciclobium* sp.), não hospedeira, outros compostos foram mais abundantes como 1-octen-3-ol (**110**), 3-octanona (**111**) e o 3-octanol (**112**) (Figura 45).

⁴⁹ Trabalho de observação e coleta realizado pela bióloga Msc. Adriana T. Salomão IB-UNICAMP.

⁵⁰ Zhang, Z. M.; WeiWu, W.; Li, G.J. *Chrom. Scienc.* **2009**, 47, 291-296.

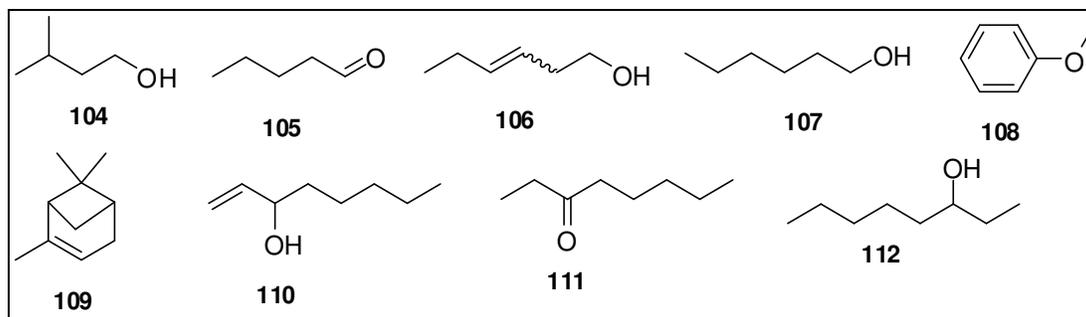


Figura 45. Compostos voláteis detectados nas plantas analisadas.

Foram detectados nas espécies de plantas hospedeiras estudadas, compostos voláteis comuns aos percevejos *Phloea subquadrata* e *Phloeophana longirostris*. Na análise dos voláteis de *Eugênia acutata*, além dos compostos apresentados (Figura 45) foi possível detectar o aldeído (*E*)-2-hexenal (**10**) e os sesquiterpenos, α -gurjuneno (**87**) e o α -aromadendreno (**91**). Para as espécies *Eugênia blasthantha*, *Eugênia sp.* somente o composto limoneno (**76**), encontrado nos adultos de *Phloeophana longirostris*, teve destaque. A espécie *Eugênia neoverrucosa* apresentou o sesquiterpeno β -humuleno (**53**), comum a ambas as espécies de percevejos estudadas, como o composto mais abundante em relação aos demais detectados. No entanto, as espécies *Myrciaria floribunda* var. “vermelha” e *Myrciaria floribunda* var. “branca”, não apresentaram nenhum composto majoritário comuns aos percevejos.

De maneira geral, a seleção de uma planta hospedeira por um inseto herbívoro, é um processo que envolve vários critérios, e os voláteis emitidos pela planta é apenas um dos sinais para seleção.⁵¹ A presença de outros insetos, danos físicos pré-existentes, luminosidade e balanço hídrico são condições que influenciam os herbívoros a diferenciarem habitats potenciais para sua permanência.^{52,53} Além disso, ambas as espécies de percevejo estudadas, apresentam características morfológicas (fenotípicas) do corpo que remetem a estrutura do tronco da planta selecionada pelo inseto.^{14,15}

⁵¹ Magro, J. N.; et. al. *Chemoecol.* **2007**, 17, 37-45.

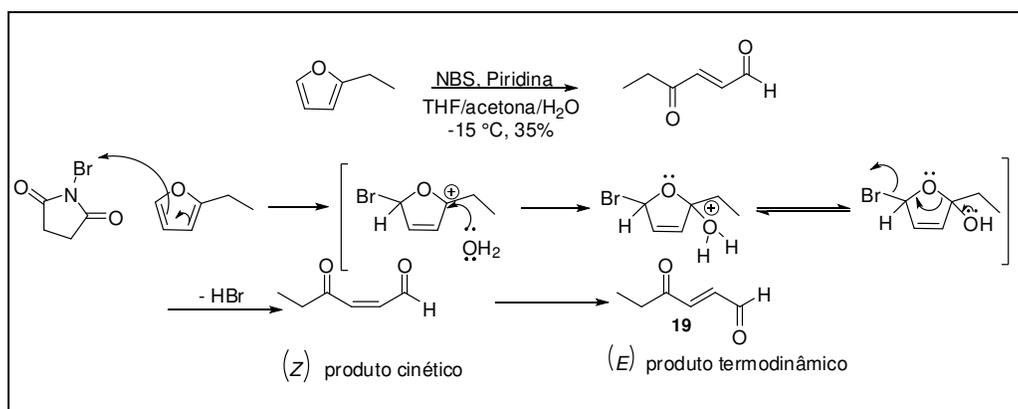
⁵² McGuire, R. J.; Johnson, M. T. *J. Ecol. Entomol.* **2006**, 31, 20-31.

⁵³ Gouinguene, S. P.; Turlings, T. C. *J. Plant Physiol.* **2002**, 129, 1296-1307.

Os compostos voláteis emitidos a partir das plantas podem mediar um variado conjunto de interações ecológicas. Essas interações podem desempenhar papéis importantes na defesa contra os próprios herbívoros e na atração de polinizadores para as plantas.⁵⁴ Alguns voláteis emitidos, induzem uma resposta a herbivoria que pode modificar a capacidade de um herbívoro em selecionar uma planta hospedeira. Além disso, podem fornecer sinais para as plantas vizinhas, não danificadas, se prepararem para um possível ataque.⁵⁵ No entanto, a correlação dos voláteis dos insetos com os da planta hospedeira, poderá ser confirmada por meio de análises como a de isótopos estáveis de carbono.⁵⁶

3.5. Sínteses de Padrões

Dois compostos foram sintetizados, o álcool insaturado (*E*)-2-hexen-1-ol (**12**) e o oxo-aldeído (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**). O (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**) foi sintetizado a partir de 2-etilfurano na presença de N-bromosuccinimida (NBS), em piridina, THF, acetona e água, obtendo-se um rendimento final de 35% (Esquema 1).^{57,58}



Esquema 1. Proposta de reação para formação do produto (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**).

⁵⁴ Pareja M.; et. al. *PLoS ONE*. **2012**,7, 31971. doi:10.1371/journal.pone.0031971.

⁵⁵ Herrmann, A. *The Chemistry and Biology of Volatiles*. **2010**.

⁵⁶ Hood-Nowotny, R.; Knols, B. G. J. *Entomol. Experimental. Appl.* **2007**, 124, 3-16.

⁵⁷ Dauben, H. J.; McCoy, L. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**,81,4863-4873.

⁵⁸ Kobayashi, Y.; et. al. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7505-7515.

Utilizando este procedimento, foi possível obter o isômero (*Z*) produto cinético da reação, e o isômero (*E*), produto termodinâmico.⁵⁹ Porém, a caracterização química por RMN de ¹H e ¹³C só foi possível para o produto o (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**).⁶⁰

A co-injeção do produto sintético bruto, com o produto natural, permitiu confirmar que o composto sintetizado, (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**), se tratava realmente do mesmo produto encontrado na glândula, por apresentar o mesmo tempo de eluição (Figura 46).

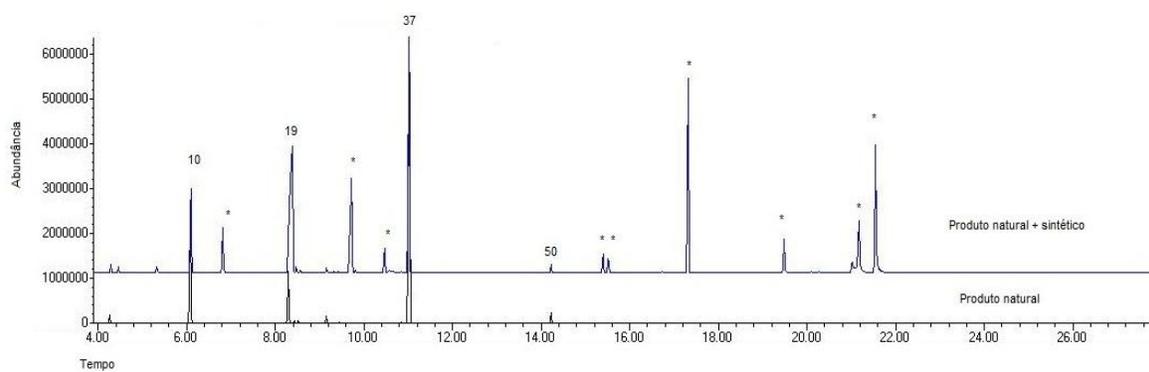


Figura 46. Cromatogramas de íons totais (CG-EM) referentes à co-injeção do produto sintético (*E*)-4-oxo-2-hexenal com o conteúdo glandular de fêmea de *Phloea subquadrata*. Condições de análise: 40 °C (3 min), seguida de 10 °C·min⁻¹ até 290 °C. Numeração dos picos conforme Anexo 6.

Durante o processo de purificação foi possível separar quatro compostos que apresentavam íons moleculares de *m/z* 224 que correspondem ao dobro da massa do (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**) (*m/z* 112) (Figura 47, Anexo 141).

⁵⁹ MacLeod, J.K.; Bott, G.; Cable, J. *Aust. J. Chem.* **1977**, 30, 2561-4.

⁶⁰ Moreira, J. A.; Millar, J. G. *J. Chem. Ecol.* **2005**, 31, 956-968.

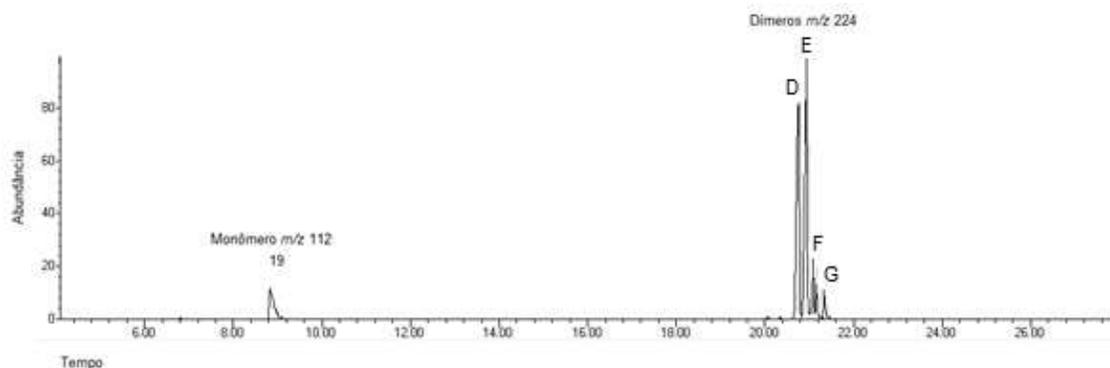


Figura 47. Cromatograma de íons totais (CG-EM) dos produtos sintéticos referentes aos dímeros do 4-oxo-2-hexenal (D, E, F e G). Condição de análise: 40°C (3 min), seguida de 10 °C·min⁻¹ até 290°C. Tempo de retenção D: 20,75 minutos; E: 20,94 minutos; F: 21,09 minutos; G: 21,16 minutos.

Compostos com espectros de massas similares foram detectados no extrato de ninfas de 5° ínstar, nas amostras de exúvias e nas glândulas de machos e fêmeas da espécie *Phloea subquadrata* (Figura 48, Anexo 142).

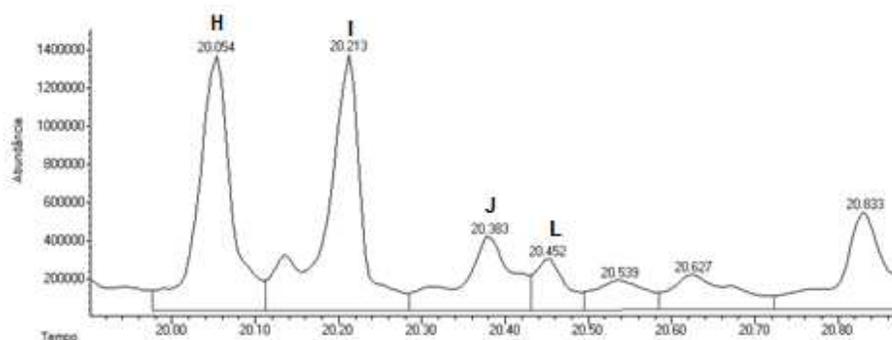


Figura 48. Cromatograma de íons totais (CG-EM) do conteúdo glandular de macho *Phloea subquadrata* (na ausência de solventes), mostrando os 4 dímeros naturais (m/z 224). Condições de análise: 40°C (3 min)-290 °C (10 °C·min⁻¹). Numeração dos picos cromatográficos conforme Tabela 3.

Existem relatos na literatura da presença desses dímeros em exúvias de *Nezara viridula*, em extratos de outras espécies de percevejos. No entanto, são considerados artefatos produzidos espontaneamente a partir da secreção dos compostos.⁶¹ Em um bioensaio, com antenas do percevejo (*Piezodorus hybneri*) utilizando os dímeros na concentração 0,01 mg·mL⁻¹, foi possível obter uma forte

⁶¹ Aldrich, J. R., et al. *Z. Naturforsch.* **1993**, 48, 73-79.

resposta da antena na análise por CG-EAD (cromatografia gasosa acoplada à eletroantenografia).⁶²

Estes dímeros foram somente detectados por espectro de massas e as estruturas dessas moléculas não foram elucidadas. Entretanto o processo de dimerização de cetonas α , β -insaturadas pode ocorrer através de reações de Diels-Alder, justificando a presença desses dímeros.⁶³

⁶² Oduor, A. *Master's thesis*, 2007, Wageningen Universiteit. Netherlands. 96 pg.

⁶³ Lian, G.; Yu, B. *Chem. Biodiver.* **2010**,7, 2660-2690.

4. CONCLUSÕES

Este trabalho relata, pela primeira vez, a composição química dos voláteis e do conteúdo glandular de machos, fêmeas e ninfas (1° ao 5° ínstaes) presentes nas espécies de percevejos *Phloea subquadrata* e *Phloeophana longirostris*.

Na espécie *Phloea subquadrata* todas as ninfas apresentam os aldeídos insaturados (*E*)-2-pentenal (**5**), (*E*)-2-hexenal (**10**) e (*E*)-2-octenal (**32**), juntamente com o (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**). Já nos adultos desta espécie predominam o (*E*)-2-hexen-1-ol (**12**) e o acetato de (*E*)-2-hexenila (**28**). Além desses dois compostos os sesquiterpenos **53** e **54** foram encontrados apenas nos adultos. Com base em dados da literatura, o cariofileno (**53**) atua como feromônio de atração para várias espécies de percevejos. Como esse composto foi detectado apenas nos machos de *Phloea subquadrata*, esse fato é importante para estudos de atração sexual.

As ninfas (2° a 4° ínstaes) da espécie *Phloeophana longirostris* apresentaram o (*E*)-2-hexenal (**10**), (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**19**), decano (**24**), (*E*)-2-octenal (**32**), undecano (**37**) e o tridecano (**50**) como compostos majoritários. Já os adultos revelaram o (*E*)-2-hexen-1-ol (**12**) e o acetato de (*E*)-2-hexenila (**28**) como compostos majoritários exclusivos. Vale ressaltar que o mesmo padrão de compostos majoritários foi detectado em *Phloea subquadrata*.

As análises dos voláteis liberados após estímulo levaram a identificação de 100 compostos. Destes, 44 foram exclusivos da espécie *Phloeophana longirostris* e 12 da espécie *Phloea subquadrata* e 44 comuns a ambas. Essa variedade de compostos, liberados após estímulo, mostra a complexidade que pode existir nos sistemas que envolvem as defesas químicas desses insetos. Além disso, foi possível discriminar nas fêmeas de *Phloeophana longirostris* uma série de sesquiterpenos exclusivamente detectados nesse grupo.

Devido ao elevado número de compostos detectados e do número de indivíduos envolvidos, a análise de PLS-DA auxiliou a organização dos resultados. Apesar destes insetos pertencerem à mesma família (Phloeidae), e a gêneros diferentes, existe uma clara distinção dos voláteis liberados por *Phloea subquadrata* e *Phloeophana longirostris*. Além disso, foi possível verificar que

existem diferenças entre os compostos voláteis liberados pelos indivíduos da mesma espécie. Dessa forma, de acordo com os diferentes ínstares, ocorre uma variação no padrão de liberação dos principais voláteis. Além disso, foi possível verificar que existe uma discriminação entre os voláteis liberados por machos e fêmeas.

As análises das plantas, utilizadas como abrigo e fonte de alimentação por indivíduos da espécie *Phloea subquadrata*, revelaram cinco compostos comuns aos voláteis liberados pelos insetos dessa espécie e de *Phloeophana longirostris*. No entanto, não foi possível estabelecer uma relação direta entre os compostos presentes nas plantas hospedeiras com os voláteis dos insetos. Estudos de razão isotópica (IRMS, *Isotope Ratio Mass Spectrometry*), a partir da planta e do conteúdo glandular, poderão fornecer dados para auxiliar nesta correlação.

Por fim, tornam-se necessários ensaios de campo para entendermos a função desses compostos para os percevejos. Apesar de conhecermos os principais componentes glandulares de ambas as espécies, as estratégias para teste de campo ainda são complexas. O elevado número de compostos detectados e a pouca informação existente sobre as espécies, eleva o número de variáveis que podem ser geradas. A realização de bioensaios, a partir do uso das antenas dos insetos como biossensores (CG-EAD), poderá auxiliar na seleção dessas moléculas. Assim, será possível a seleção de compostos, para cada grupo de insetos, o que facilitará o desenho experimental para testes de campo.

CAPÍTULO II.

Oxirredutases de *Bacillus safensis* isolado do Petróleo

5. INTRODUÇÃO

5.1. Micro-organismos do Gênero *Bacillus*

Os micro-organismos do gênero *Bacillus* incluem mais de 60 espécies, com ampla ocorrência na natureza. A capacidade de sobreviver nos mais variados ambientes é favorecida por um sofisticado mecanismo de defesa, expresso quando o micro-organismo é submetido a condições inóspitas.⁶⁴ Esse mecanismo, está relacionado com a habilidade de alterar temporariamente a expressão de genes, que modificam o fenótipo de algumas células levando a formação dos esporos.^{65,66} Nessa estrutura o material genético do micro-organismo se mantém protegido por membranas, juntamente com o conteúdo citoplasmático.⁶⁷

É reportado que esporos de *Bacillus* exibem uma extraordinária resistência à radiação ultravioleta (UV), produtos químicos (tais como peróxidos e hipoclorito) e ao calor. Essas características interferem diretamente em questões econômicas, ambientais e de saúde pública.⁶⁸ Alguns ambientes considerados completamente assépticos pelos métodos de limpeza e esterilidade, como as salas de montagem de naves espaciais, revelaram a existência de uma diversidade microbiana com predominância de dois micro-organismos *Bacillus licheniformis* e *Bacillus pumilus*.⁶⁹

Os perfis metabólicos, bioquímicos e moleculares de cepas de *Bacillus pumilus*, isoladas da sala de montagem de naves espaciais da NASA (*Spacecraft Assembly Facility*), foram analisados, revelando-se um grupo diferenciado de *Bacillus* que poderia pertencer a um novo táxon.^{70,71}

⁶⁴ Setlow, P. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **2001**, 38-97.

⁶⁵ McKenney, P.T.; Driks, A.; Eichenberger, P. *Nature Review. Microb.* **2013**, 11, 33-44.

⁶⁶ Dahl, M.K. *Bacillus*. *Academic Press*. **1999**, University of Erlangen, Germany.

⁶⁷ Priest, F. G. *Biotechnology: Bacillus*. *Academic Press*. **2008**.

⁶⁸ Nicholson, W.; et. al. *Microb. Molec. Biol. Rev.* **2000**, 64, 3, 548-572.

⁶⁹ La Duc, M. T.; Kern, R.; Venkateswaran, K. *Microb. Ecol.* **2004**, 47, 150-158.

⁷⁰ NASA, "National Aeronautics and Space Administration".

⁷¹ Dickinson, D.N.; et. al. *J. Microb. Methods*. **2004**, 58, 1-12.

Trabalhos subsequentes, a partir da sequência do gene da *girase-B*, revelaram que essas cepas diferenciadas de *Bacillus pumilus*, pertenciam realmente a uma nova espécie de micro-organismo, denominada como *Bacillus safensis*.⁷² Esse micro-organismo recebeu esse nome em homenagem ao local que foi descoberto (SAF “*Spacecraft Assembly Facility*”).⁷³

5.2. *Bacillus safensis*

Existem na literatura poucos trabalhos a respeito do *Bacillus safensis*. A partir da análise da cepa FO-36b^T foi verificado que este micro-organismo é Gram-positivo, mesófilo, aeróbio e quimiotrófico, apresentando esporos como estruturas de resistência e flagelos para locomoção.⁷⁴ Além dessas características, foram detectadas algumas oxirredutases (oxidase e catalase) e hidrolases (esterases e β -galactosidases).⁷²

Em amostras de solo do deserto da Mongólia foi isolada a cepa de *Bacillus safensis* MS11, identificada através da sequência do gene rRNA 16S com similaridade de 99,439% em relação a cepa FO-36b^T. Esta cepa (MS11) revelou tolerância a elevadas concentrações de arsênio e boro além da capacidade de oxidar o arsênio.⁷⁵

Uma terceira cepa (JUCHE 1) do *Bacillus safensis*, isolada de soro de leite, foi patenteada. A descrição apresenta o potencial de aplicação dessa cepa nos processos de fermentação e na detoxificação de metais pesados em efluentes industriais, entre outras.⁷⁶ Além dessa patente, mais dois trabalhos são apresentados na literatura com aplicação dessa cepa (JUCHE 1). Em um deles é abordada a capacidade probiótica desse micro-organismo, e em outro é reportada a purificação e caracterização de uma hidrolase do tipo β -galactosidade.^{77,78}

⁷² Satomi, M.; et al. *International J. of System. and Evolution. Microbiol.* **2006**, 1735-1740.

⁷³ Sala de Montagens de Veículos Espaciais. *Jet Propulsion Laboratory - NASA*. Pasadena, CA, USA.

⁷⁴ Probst, A.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, 77, 1628-1637.

⁷⁵ Raja, C. E.; Omine, K. *African J. Biotechnol.* **2012**, 11, 9, 2267-2275.

⁷⁶ Nath A.; Chowdhury, R.; Bhattacharjee, C. **2011**, J42539 [52].

⁷⁷ Nath, A.; Ghosh, S.; Chowdhury, R.; Bhattacharjee, C. *Inter. J. System. Algorith. Appl.* **2012**, 2, 2277-2677.

⁷⁸ Nath, A.; et. al. *ICABPS.* **2013**, 7-16.

No nosso grupo de pesquisa (IQ-UNICAMP), uma cepa de *Bacillus safensis* CFA06 foi isolada de uma amostra de petróleo biodegradado. Essa amostra de petróleo é originada do Campo Pintassilgo da Bacia Potiguar, localizada no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil.⁷⁹ Triagens enzimáticas da cepa (CFA06) revelaram que a mesma expressa epóxido-hidrolases, esterases e monoxigenases. Esta última, pertencente à grande classe das oxirredutases, chamou a atenção por apresentar elevado potencial na degradação de compostos aromáticos.

Assim sendo, esta cepa CFA06 após total caracterização do seu potencial enzimático, teve o seu genoma sequenciado no grupo de pesquisa da Profa. Anete Pereira de Souza (CBMEG-UNICAMP), sendo o mesmo depositado na base de dados *GOLD* (*Genome Online Database*).^{80,81}

5.3. Oxirredutases

As oxirredutases são responsáveis por reações de oxidação e redução e representam a segunda maior classe (25%) de enzimas com aplicação em biocatálise.⁸² Essas enzimas podem ser organizadas de várias maneiras, e de acordo com o mecanismo de ação, são classificadas em quatro grandes grupos: oxigenases, peroxidases, oxidases e desidrogenases.

As oxigenases, oxidases e peroxidases catalisam reações de oxidação consideradas irreversíveis, pois as reações de redução do O₂ e H₂O₂ que as acompanham são altamente exotérmicas. Por outro lado, as desidrogenases são enzimas geralmente consideradas capazes de catalisar reações reversíveis, podendo ser usadas na catálise de reações de oxidação e redução.⁸³

As reações de oxidação são estratégias importantes para a transformação de grupos funcionais. Muitas dessas reações podem ocorrer espontaneamente,

⁷⁹ Isolamento da cepa CFA 06 realizado pelo Msc. Célio F.F. Angoline (IQ-UNICAMP).

⁸⁰ Sequenciamento realizado pela Dra. Priandra Rios Laborda.

⁸¹ <http://www.genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/index.cgi>.

⁸² Oliveira, L.G.; Mantovani, S.M. *Quim. Nova*. **2009**, 742-756.

⁸³ Blank, L. M.; *et. al.* *Antioxid. Redox Signaling*. **2010**, 349-394.

entretanto, outras requerem o uso de catalisadores que auxiliam na diminuição da energia de ativação necessária para a transformação química.⁸⁴

Nestas reações os biocatalisadores representam uma alternativa viável às metodologias tradicionais, pois reduzem ou eliminam o emprego de substâncias que possam causar riscos e danos ambientais, em comparação com alguns tradicionais catalisadores químicos.^{85,86,87,88} Os processos industriais que empregam catalisadores biológicos são geralmente considerados como “processos limpos”, e de acordo com os princípios da Química Verde.⁸⁹

Os processos biocatalíticos podem ser realizados através de enzimas isoladas ou por meio de enzimas que atuam em células íntegras. Ambos apresentam vantagens e desvantagens e, por isso, vários parâmetros devem ser analisados ao definir as implementações dos processos e suas condições. Uma das grandes vantagens da utilização de enzimas isoladas é a ausência de reações secundárias, as quais podem causar perdas de rendimento. Porém, essa aplicação encontra limitações devido à instabilidade e à dependência por cofatores de algumas classes de enzimas. Uma alternativa para contornar essa situação é promover a regeneração de cofatores, o que pode ser realizado através de um sistema enzimático.⁹⁰

O biocatalisador mais adequado para uma reação pode advir de várias fontes, desde enzimas disponíveis comercialmente até a triagem microbiana em coleções de cultura, amostras de solo ou bibliotecas metagenômicas.^{91,92} Ecossistemas de ambientes extremos como fontes hidrotermais, hipersalinas, geleiras, entre outras são favoráveis à prospecção. A sobrevivência de microorganismos nesses ambientes sugere uma adaptação de suas enzimas a essas

⁸⁴ Sánchez, A. V.; Zárraga, J. G. Á. *J. Mex. Chem. Soc.* **2007**,51.

⁸⁵ Sansiaume, E.; *et.al. Tetrahedron: Asymmetry.* **2010**, 1593-1600.

⁸⁶ Tan, H. S. G., *et.al. Food Chem.* **2011**, 80-84.

⁸⁷ Lin, W., *et.al. Process Biochem.* **2010**, 1529-1536.

⁸⁸ Carballeira, J. D., *et. al. Biotechnol. Advances.* **2009**, 686-714.

⁸⁹ Salomon, A. L.; Wendhausen, R. *Dynamis.* **2007**.13, 39-45.

⁹⁰ Grunwald, P. *Biocatalysis: Biochemical Fundamentals and Applications.* **2009**.

⁹¹ Koonin, E. V. *Nature Biotechnology.* **2007**, 540-541.

⁹² Mocali, S.; Benedetti, A. *Resear. Microbiology.* **2010**, 497-505.

condições o que pode ser uma característica favorável para as reações biocatalisadas.⁹³

⁹³ Borges, K.B. *et.al.Tetrahedron: Asymmetry*. **2009**, 385-397.

6. OBJETIVOS

A oportunidade de estudar o potencial enzimático do micro-organismo *Bacillus safensis*, foi um desafio para o grupo e para ciência. Foram propostos três objetivos específicos:

- ✓ Isolar as oxirredutases expressas por *Bacillus safensis* da cepa CFA06 e detectar a atividade de oxirredutase, através de substratos fluorogênicos derivados de umbeliferona;
- ✓ Purificar as proteínas do lisado celular por meio de cromatografia de troca iônica (FPLC) e separar as proteínas obtidas nas frações de acordo com a carga e a massa molecular (SDS-PAGE);
- ✓ Realizar a caracterização química e bioquímica das frações de maneira a selecionar as proteínas de interesse e submetê-las a análise por espectrometria de massas para a identificação.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Detecção da Atividade Enzimática de *Bacillus safensis*

O *Bacillus safensis* CFA06 foi submetido à triagem enzimática, utilizando substratos fluorogênicos juntamente com seus respectivos controles derivados de umbeliferona (Figura 49).

Esses ensaios necessitam da comparação entre o resultado da biorreação com um controle feito a partir do produto sintético dessa reação, considerado 100% de conversão. A reação é adicionalmente comparada a outro controle, denominado negativo, realizada na ausência do biocatalisador representando 0% de conversão.

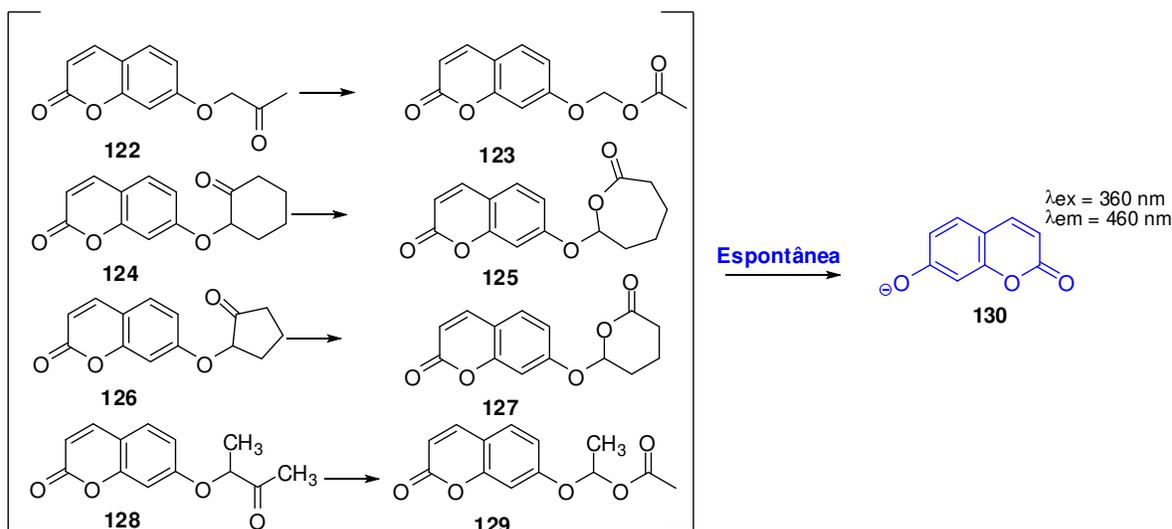


Figura 49. Substratos fluorogênicos e respectivos produtos de oxidação utilizados nos ensaios com *Bacillus safensis* (CFA06).

Os produtos provenientes da ação de monoxigenases **123**, **125**, **127** e **129** são facilmente detectados por fluorimetria (UV-VIS), em função da liberação do fluoróforo.⁹⁴ Esse modelo de ensaio enzimático utilizando substratos fluorogênicos derivados de umbeliferona foi proposto por Reymond e colaboradores para

⁹⁴ Janzen, W.P. *High-Throughput Screening: Methods and Protocols*. 2002.

enzimas isoladas, sendo adaptado em conjunto com o nosso grupo (IQ-UNICAMP) para células íntegras.^{95,96}

Nesse ensaio de triagem enzimática, o *Bacillus safensis* apresentou atividade catalítica, demonstrando preferência pelo substrato **122** e parcialmente pelo **126**. As reações foram consideradas positivas quando as porcentagens de conversão do substrato avaliado no produto de interesse foram superiores a 5% (Tabela 7). Desta maneira, os substratos **124** e **128** não atingiram o limite mínimo de conversão no tempo de reação padronizado.

Tabela 7. Resultados obtidos (%) com *Bacillus safensis* cepa CFA06 nos ensaios com substratos (122-128) para detecção de oxigenases

Tempo de reação	Substrato (122)	Substrato (124)	Substrato (126)	Substrato (128)
24horas	6,4	-	-	-
52horas	11,3	-	6,6	-
76horas	11,2	-	5,0	-
96horas	8,6	-	5,0	-

* (-) indica atividade enzimática com limite inferior a 5% de conversão do substrato no produto de interesse.

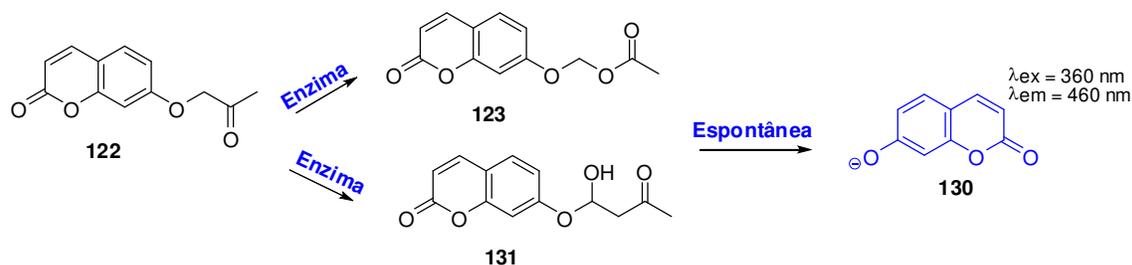
O substrato **122** apresentou a melhor porcentagem (11,3%) de conversão após 52 horas de incubação, revelando a ação de oxigenases. Essas enzimas podem atuar na incorporação de um (monoxigenases) ou dois (dioxigenases) átomos provenientes do oxigênio molecular em diferentes substratos orgânicos.⁹⁷

As reações apresentadas na oxidação dos substratos **122** e **126**, propõem a atuação de enzimas pertencentes a classes das oxirredutases, entre elas estão as Baeyer-Villiger monoxigenases (**123**), enzimas do tipo citocromo P450 e peroxidases (**131**) (Esquema 2).

⁹⁵ Klein, G.; Reymond, J.L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1113-1116.

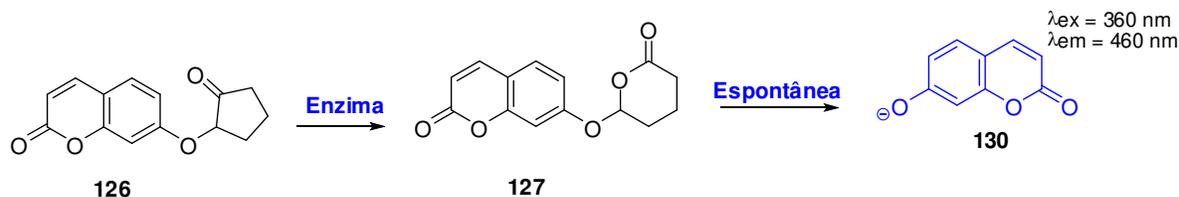
⁹⁶ Bicalho, B. *et al. J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *6*, 911-916.

⁹⁷ Hegeman, A. D.; Frey, P.A. *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Oxford University Press. **2007**.



Esquema 2. Substrato **122**, com os possíveis produtos **123** e **131** após oxidação enzimática, levando a posterior formação do ânion umbeliferila (**130**).

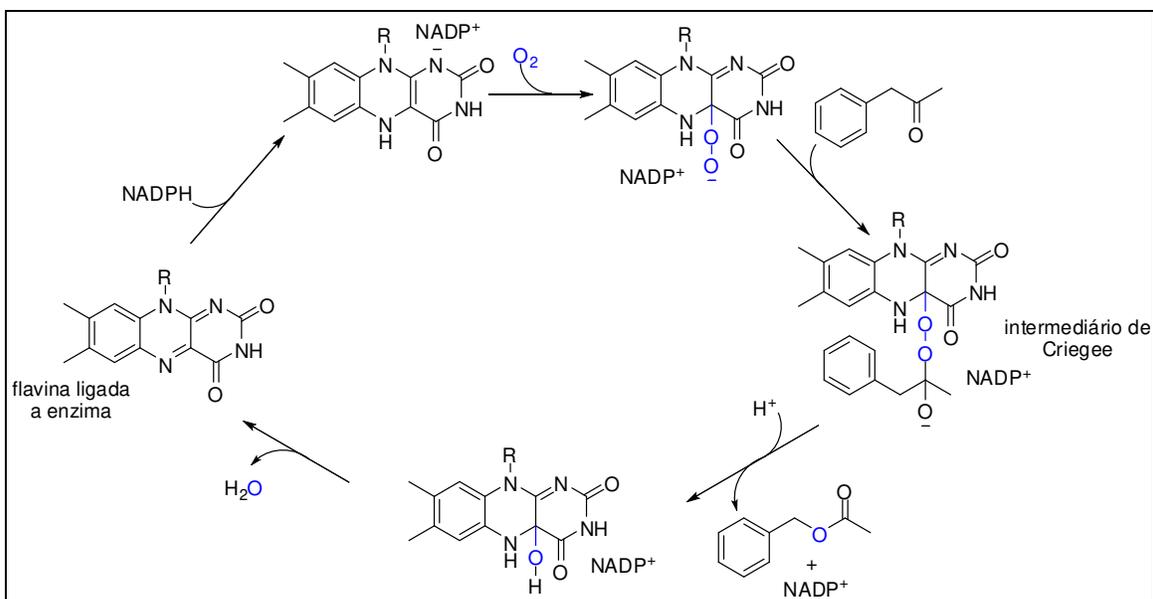
A atuação do micro-organismo sobre o substrato **126** demonstrou uma porcentagem de conversão de 6,6%, após 52 horas de incubação, revelando baixa eficiência enzimática para esse composto (Esquema 3).



Esquema 3. Substrato **126**, com o produto **127** após oxidação enzimática levando a posterior formação do ânion umbeliferila (**130**).

A atividade enzimática apresentada, de acordo com os produtos formados **123** e **127** é do tipo Baeyer-Villiger monoxigenases. Essas enzimas são normalmente dependentes de flavina, e são capazes de converter cetonas em ésteres ou lactonas, através do mecanismo proposto utilizando o NAD(P)H como cofator.⁹⁸

⁹⁸ Faber K. *Biotransformations in organic chemistry*. 4th ed. Springer. 2004.



Esquema 4. Ciclo catalítico da Baeyer-Villiger monoxigenase.⁹⁹

O ciclo se inicia com a redução do FAD pelo NAD(P)H e uma rápida oxidação da flavina através do oxigênio molecular, formando o ânion peróxido de flavina ainda na ausência de substrato. Este peróxido atua como nucleófilo e ataca o substrato carbonílico formando uma estrutura tetraédrica, denominado “Intermediário de Criegee”. O ciclo catalítico é encerrado com a eliminação de uma molécula de água levando à regeneração do FAD.¹⁰⁰

As enzimas do sistema citocromo P450 são monoxigenases heme-dependentes que atuam no transporte de elétrons do NAD(P)H para o oxigênio molecular, transferindo oxigênio para o substrato.¹⁰¹ Essas enzimas não estão apenas envolvidas nas reações de hidroxilação, mas também em reações de sulfoxidação, epoxidação e desalogenação, entre outras.¹⁰² De acordo com o sistema redox, as P450 podem ser organizadas em quatro grupos distintos (Figura 50).

⁹⁹ Figura adaptada: Mihovilovic, M. D. *et. al. Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3711-3730.

¹⁰⁰ Mihovilovic, M.D., Müller, B., Stanetty, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3711-3730.

¹⁰¹ Wong, L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 263-268.

¹⁰² Mansuy, D. *Comp. Biochem. Physiol.* **1998**, 5-14.

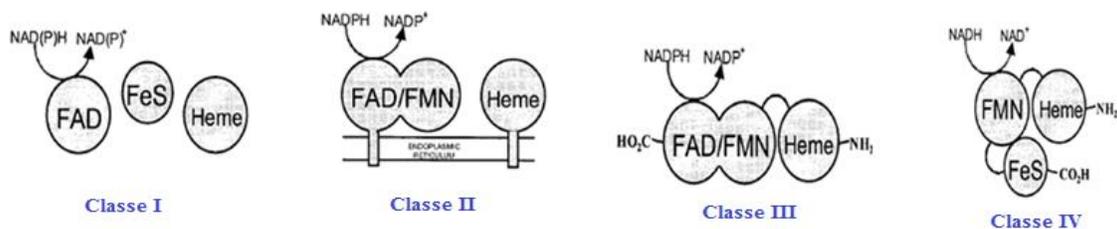


Figura 50. Classificação da P450 conforme o sistema de transferência de elétrons.¹⁰³

Muitas bactérias apresentam a classe I, que requer uma redutase contendo FAD e uma redoxina ferro-enxofre. A classe II, normalmente encontrada no retículo endoplasmático, requer uma cadeia simples de peptídeos contendo o domínio FAD/FMN redutase para o transporte de elétrons. A classe III não requer doadores de elétrons, pois utiliza a via do peróxido de hidrogênio para realizar a oxidação, sendo considerada auto-suficiente. As enzimas da classe IV, no entanto, recebem seus elétrons diretamente do NAD(P)H.¹⁰⁴

A partir dos dados obtidos, não foi possível definir o tipo específico de enzima que atuou sobre os substratos fluorogênicos, entretanto a atividade apresentada revela ação de oxidases ativas de *Bacillus safensis* CFA06.

7.2. Purificação das Oxirredutases de *Bacillus safensis*

A partir da triagem enzimática, procurou-se estabelecer um protocolo de purificação das proteínas, a fim de obter frações ativas frente ao substrato fluorogênico 122.¹⁰⁵

Os lisados celulares, provenientes dos cultivos do micro-organismo em meio (GYM), na presença e na ausência de fenantreno¹⁰⁶, foram purificados por cromatografia rápida de proteínas (FPLC, *Fast Performance Liquid Chromatography*) com resinas de troca iônica (catiônica e aniônica).^{107,108} As

¹⁰³ Figura adaptada: Roberts, G. A., et al. *J. Bacteriol.* **2002**, 3898-3908.

¹⁰⁴ Roberts, G. A., et al. *J. Bacteriol.* **2002**, 3898-3908.

¹⁰⁵ Phillips, I.R.; Shephard, E.A. *Methods in Molecular Biology: Cytochrome P450 Protocols.* **1998**.

¹⁰⁶ Substrato orgânico metabolizado pela cepa (CFA06). Angoline, C.F.F. Dissertação de mestrado (IQ-UNICAMP). **2010**.

¹⁰⁷ Grogan, G. *Practical Biotransformations: A Beginner's Guide.* British Library, **2009**.

proteínas foram purificadas de acordo com a carga líquida da cadeia lateral que estabelece uma interação eletrostática com a fase estacionária utilizada no processo cromatográfico.¹⁰⁹ As proteínas foram separadas, de acordo com o seu ponto isoelétrico, e coletadas em frações de 1 mL. No total foram coletadas 80 frações, da purificação sem fenantreno, sendo 40 da troca catiônica e 40 da aniônica, e o mesmo número de frações foi coletado para a purificação com o fenantreno. As proteínas quando expostas a um pH abaixo do seu ponto isoelétrico, adquirem grupos protonados que permitem a interação com a fase estacionária da coluna de troca catiônica. Assim como para um pH acima do ponto isoelétrico, adquirem grupos desprotonados permitindo a interação com a fase estacionária de coluna de troca aniônica.¹¹⁰

As frações obtidas na purificação, tanto da troca catiônica e da troca aniônica, foram submetidas ao processo de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*).¹¹¹ Foi possível separar as proteínas presentes em cada fração de acordo com a massa molecular. As frações provenientes da troca aniônica apresentaram uma separação eficiente, apesar da quantidade elevada de proteínas (Anexo 149). Para a troca catiônica, foi possível visualizar uma banda predominante no gel nas frações (7 e 13) que apresentou uma massa molecular entre 18 e 25 kDa e outras proteínas nas frações (3 e 5), que são referentes ao *flow through*¹¹² (Figura 51). Foram utilizados marcadores moleculares de 116 a 14 kDa.

¹⁰⁸ Análise realizada em colaboração com a Prof^a. Dra. Anete P. de Souza (CBEMG-UNICAMP).

¹⁰⁹ Rehm, R. *Protein Biochemistry and Proteomics*. Elsevier. **2006**.

¹¹⁰ Choudhary, G.; Horvath, C. *Methods Enzymol.* **1996**, 270, 47-82.

¹¹¹ Análise realizada em colaboração com Prof. Dr. Francisco M. Reis (IQ-UNICAMP).

¹¹² Proteínas que não apresentam interação com a fase estacionária.

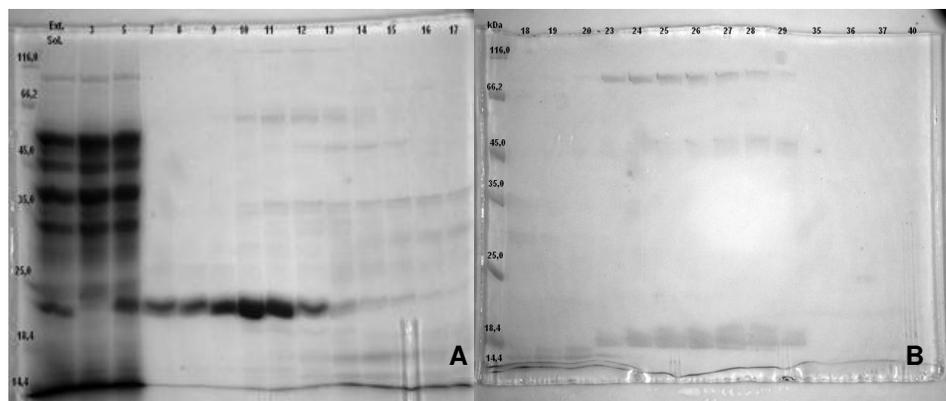


Figura 51. Gel SDS-PAGE contendo, no primeiro canal do pente o marcador de peso molecular (*Broad Range Protein Ladder*), seguido do extrato solúvel, (3 e 5) *flow through* e das frações coletadas (3 a 17; gel **A**) e (19 a 40; gel **B**).

7.3. Monitoramento das Atividades de Oxirredutases nas Frações Purificadas de *Bacillus safensis*

Diante do nosso interesse por enzimas que realizam reações de oxirredução, realizamos três diferentes testes com as frações:

- a) triagem com o substrato fluorogênico **122**, com adição de cofatores (para evidenciar a presença de: BVMO ou P450)
- b) detecção do grupo Heme para distinguir BVMO de P450
- c) detecção de metais
- d) teste do peróxido de hidrogênio para detecção de catalases.

7.3.1. Teste com substrato fluorogênico

O ensaio de triagem, com as frações obtidas da purificação, para as oxigenases, foi realizado utilizando substrato fluorogênico **122** juntamente com seu respectivo controle **123**. Nesse caso, somente o substrato **122** foi utilizado,

pois apresentou os melhores percentuais de conversão com células íntegras do *Bacillus safensis* (resultado descrito no item 7.1).

Os testes foram realizados com as frações provenientes da troca catiônica e aniônica. Nesses ensaios adicionamos, em cada poço da placa de 96 poços, a fração e três cofatores distintos (NADH, NADPH e o NAD). Isto foi necessário, pois durante o processo de purificação os cofatores, não ligados covalentemente, podem ser eluídos sem a proteína. Após incubação e leitura das placas, nenhuma fração da troca aniônica revelou atividade. No entanto, os testes foram positivos para as frações da troca catiônica, na presença do fenantreno e na ausência do fenantreno.

O percentual de conversão foi maior, nas frações da troca catiônica obtidas do cultivo do *Bacillus safensis* com fenantreno. Além dessas frações ativas, o extrato solúvel¹¹³ também apresentou atividade enzimática frente ao substrato testado (Anexo 151). A fração 03 apresenta algumas proteínas presentes no *flow through*, no entanto as frações de 10 a 15, revelaram uma única banca predominante no gel de SDS-PAGE com massa molecular entre 18 e 21 kDa.

A estratégia de adicionar o fenantreno ao meio de cultivo foi baseada em trabalhos anteriores do grupo, onde o *Bacillus safensis* foi capaz de oxidar esse composto.¹¹⁴ Como já apresentado no cromatograma da purificação (FPLC-UV) e nos géis (em anexo), foi detectada uma maior quantidade de proteína no cultivo com o fenantreno, o que pode indicar uma possível indução na síntese proteica.

7.3.2. Teste de detecção do grupo heme

A atividade presente nas frações 03 e 10 - 15 poderiam ser referentes à BVMO ou outras monoxigenases do tipo P450. Esta última enzima é facilmente caracterizada pela sua absorbância em 450 nm, na presença de monóxido de carbono e dititionito de sódio. Curiosamente, o pico máximo de absorção para as frações de 10 a 15 foi em 315 nm e não em 450 nm

¹¹³ Sobrenadante do lisado celular que não foi submetido à purificação.

¹¹⁴ Angolini, C.F.F. Dissertação de mestrado. 2010. IQ-UNICAMP.

Figura 52).

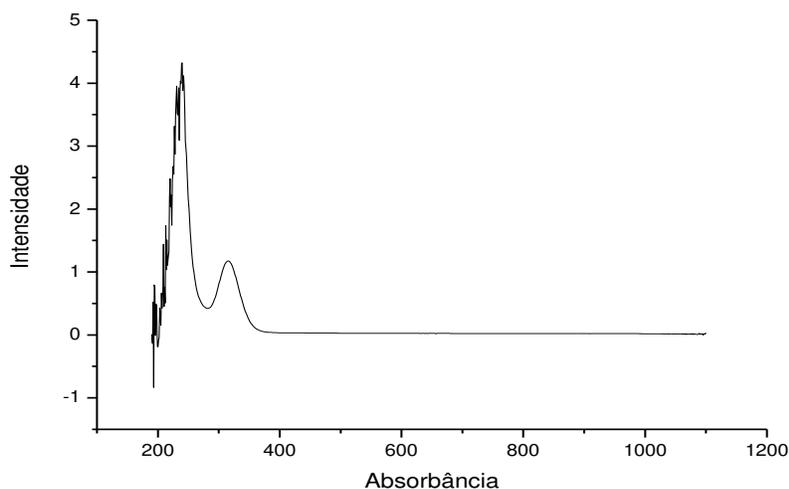
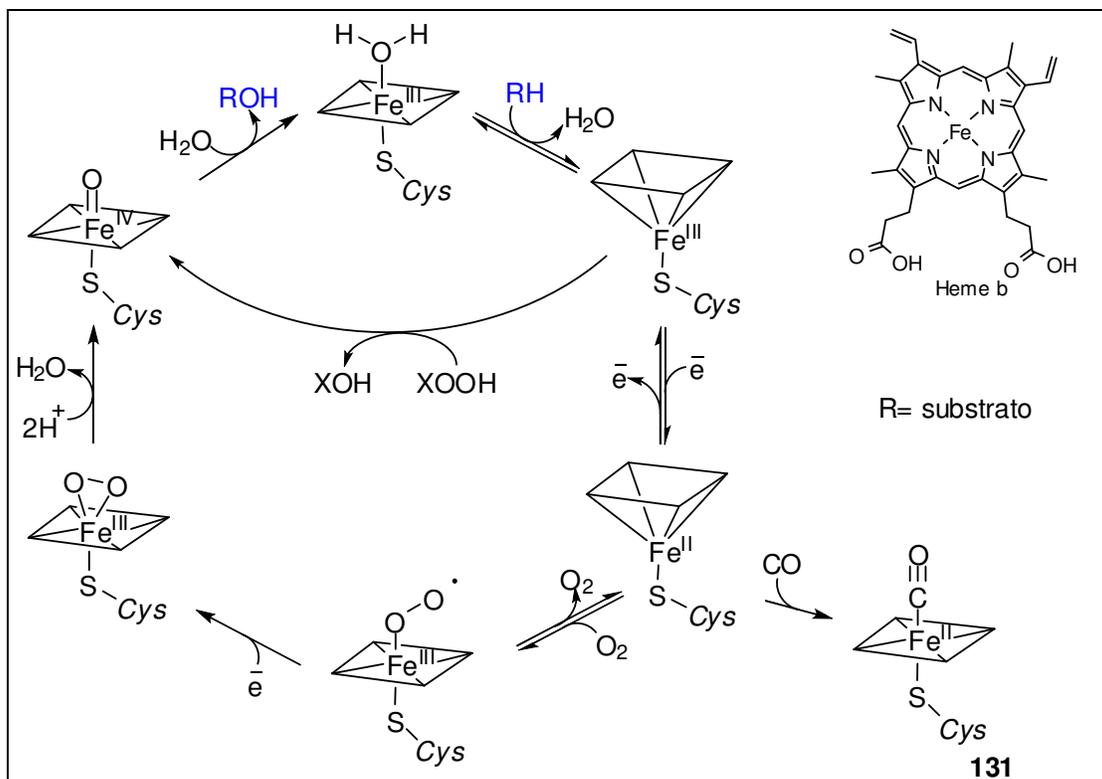


Figura 52. Espectro no ultra-violeta (UV) mostrando a absorção máxima da fração que contém a enzima responsável pela oxidação na presença de monóxido de carbono e ditionito de sódio.

Com esse resultado, podemos inferir que as proteínas presentes nas frações não se tratavam de enzimas do sistema citocromo P450. Esse teste é específico para essa classe de enzimas e somente é considerado positivo, quando é fornecida uma banda em 450 nm devido à formação do composto **131**.

Algumas propostas de ciclo catalítico, para essa classe enzimática, são reportadas na literatura e apresentam a formação do composto **131**. Em um deles o ciclo catalítico da P450 se inicia com a mudança de conformação da enzima na forma livre que contém o ferro do grupo heme hexacoordenado. Essa coordenação do Fe (III) é realizada com os quatro nitrogênios do grupo porfirínico, com um resíduo conservado de cisteína e com uma molécula de água. A aproximação do substrato ocasiona uma alteração na conformação da enzima que libera a molécula de água, permitindo a redução do Fe (III) a Fe (II) pela doação de um elétron via cofator. Esse novo intermediário formado se liga covalentemente ao oxigênio molecular, formando um intermediário dioxigenado. Mais um elétron e transferido ao sistema, seguido de uma rápida protonação formando o composto ferro-oxo. Esse composto sofre uma clivagem heterolítica na ligação O-O levando a formação de uma molécula de água e do cátion radical altamente reativo Fe (IV), também conhecido como Composto **I**. Essa espécie é a responsável por hidroxilar

o substrato, e após a formação do produto a enzima retorna ao estado inativo contendo o Fe (III) hexacoordenado (Esquema 5).¹¹⁵



Esquema 5. Proposta de mecanismo da hidroxilação de substratos através da P450¹¹⁶.

Este resultado negativo dirigiu as pesquisas para proteínas que não apresentam grupo prostético heme, porém com capacidade de oxidar metilenos quimicamente ativados. O pico de absorção em 315 nm, obtido pela presença do monóxido de carbono e do agente redutor ditionito de sódio, na literatura é atribuída a metano-oxigenases contendo ferro ligado a outros metais.^{117,118} Neste trabalho essa proteína foi denominada de oxirredutase BsP315. Dessa maneira, realizamos a análise qualitativa dos metais nas frações ativas.

¹¹⁵ Prasad, S.; *et. al. Indian Nat. Sci Acad.* **2004**, 283-291.

¹¹⁶ Figura adaptada: Prasad, S., *et al. Indian Nat. Sci. Acad.* **2004**, 283-291.

¹¹⁷ Garner, C.D.; Collison, D.; Pidcock, E. *Adv. Coord. Chem.* **1996**, 354, 325-357.

¹¹⁸ Shteinman, A. A. *Rus. Chem. Bulletin.* **1995**, 44, 6.

7.3.3. Análise qualitativa da presença de metais

As frações ativas para oxidação do substrato **122** foram analisadas por espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (*ICP-MS Elan DRC-e, PerkinElmer*). Essa técnica é capaz, em uma única varredura, de avaliar qualitativamente, quase todos os elementos da tabela periódica.¹¹⁹

As frações e o branco (tampão de eluição das proteínas) foram diluídos previamente em ácido nítrico para minimizar a concentração de sódio nas amostras. O resultado revelou a presença do elemento ferro e do molibdênio nas frações.¹²⁰ Esses resultados são promissores, visto que existem na literatura descrições de enzimas que estão envolvidas no metabolismo aeróbico de compostos aromáticos e apresentam íons metálicos do tipo ferro-molibdênio na sua estrutura.^{121,122,123,124}

7.3.4. Teste qualitativo para catalase

Devido à importância da catalase nos processos de estresses oxidativo e na formação de estruturas de resistências em várias espécies de *Bacillus*, decidimos investigar a presença dessa enzima nas cepas CFA06.

Para a caracterização das frações da troca catiônica, frente à atividade de uma catalase, peróxido de hidrogênio (30% v/v) foi adicionado às frações. Foi possível detectar a liberação de oxigênio, somente nas frações do *flow through*, e no extrato solúvel. Como contra prova, adicionamos o peróxido de hidrogênio diretamente na placa de cultivo contendo o *Bacillus safensis*. Como resultado, observamos também a liberação de oxigênio (Figura 53), comprovando a existência de uma catalase em *Bacillus safensis* aqui denominada de BsCat.

¹¹⁹ Ammann, A. A. *J. Mass Spectrom.* **2007**, 42, 419-427.

¹²⁰ Análise em colaboração com o Prof. Dr Marco A. Zezzi Arruda/ Msc Cícero A. L. J.IQ/UNICAMP.

¹²¹ Rhee, S-K.; Fuchs, G. *Eur. J. Biochem.* **1999**, 262, 507-515.

¹²² Kniemeyer, O.; Heider, J. *J. Biol. Chem.* **2001**. 276. 21381-21386.

¹²³ Rothery, R. A.; Workun, G. J.; Weiner, J. H. *Biochim. Biophys. A.* **2008**, 1778, 1897–1929

¹²⁴ Zhang, Y.; Rump, S.; Gladyshev, V. N. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, 255, 1206–1217.

Selecionamos outras cepas da coleção de culturas microbianas do Laboratório de Biocatálise (IQ-UNICAMP) para os testes e muitas apresentaram resultado positivo, identificadas como cepas de *Bacillus pumilus* e *Bacillus safensis*. O fato da catalase não ter sido detectada nas frações purificadas da troca catiônica, indica que o ponto isoelétrico dessa enzima, no pH do ensaio, estava abaixo de 7. Dessa maneira ela apresentava grupos desprotonados o que favoreceu a interações eletrostáticas com a fase estacionária utilizada na troca aniônica.

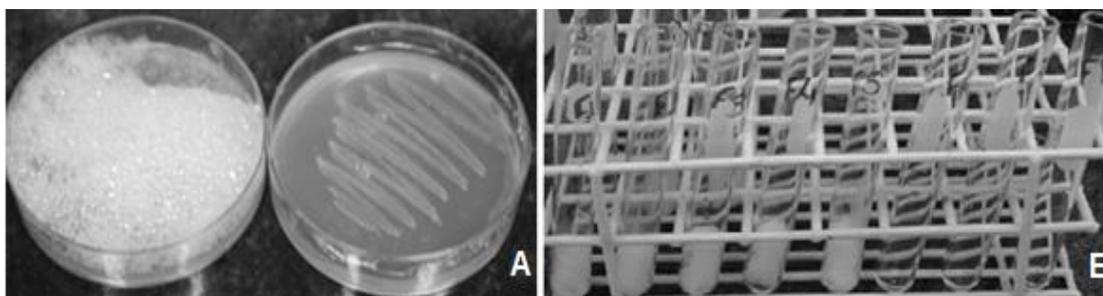


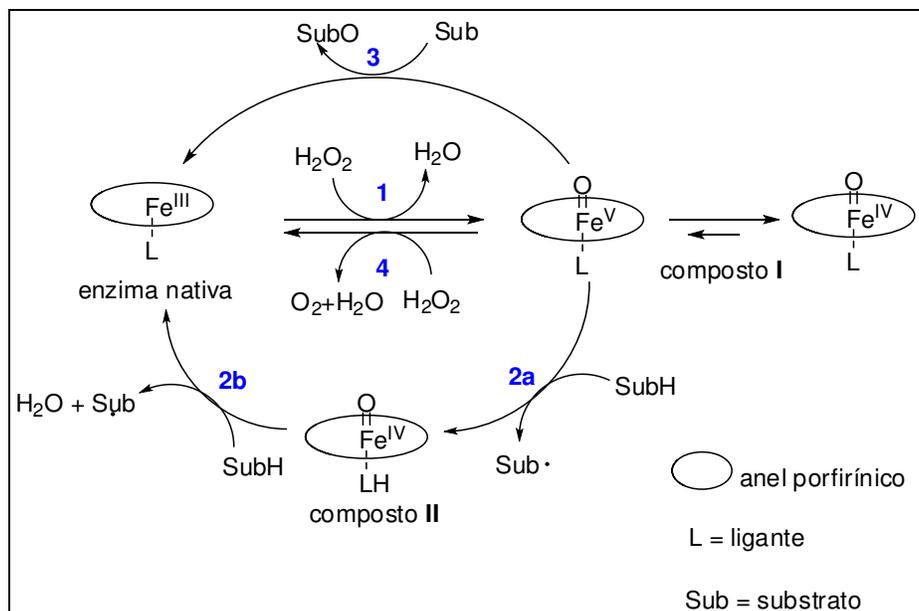
Figura 53. Resultado do teste qualitativo indicando a presença da enzima catalase. **A:** Placa com o *Bacillus safensis* placa controle. **B:** frações obtidas da purificação do extrato proteico.

As catalases pertencem ao grupo das peroxidases que utilizam o peróxido de hidrogênio como aceptor de elétrons.¹²⁵ As reações de transferência de oxigênio catalisadas por peroxidases são consideradas as mais relevantes transformações oxidativas do ponto de vista sintético¹²⁶. Elas são comparadas com as monoxigenases do tipo P450 devido à versatilidade de reações e semelhança do mecanismo, porém, com a vantagem de serem auto-suficientes na demanda por cofator (Esquema 6).¹²⁷

¹²⁵ Hamid, M.; Rehman, K. *Food Chem.* **2009**, 1177-1186.

¹²⁶ Van Deurzen, M. P. J.; *et. al. Tetrahedron.* **1997**, 13183-13220.

¹²⁷ Battistuzzi, G.; *et.al. Arch. Biochem. Biophysics.* **2010**, 21-36.



Esquema 6. Ciclo catalítico das peroxidases com grupo heme¹²⁸.

7.4. Identificação da BsP315 de *Bacillus safensis*

7.4.1. Massa exata da BsP315 por ESI(+)-QTOF/MS

Para verificar a massa exata da BsP315, a fração10 que apresentou atividade, foi analisada por ESI(+)-QTOF/MS. A técnica de ionização por *electrospray* (ESI) permite a análise de proteína intacta através da formação de íons multicarregados. A diferença entre dois picos no cromatograma, e o número de cargas no pico permitiu determinar a massa exata desta proteína, sendo 21 kDa (Figura 54).^{129,130,131}

¹²⁸ Figura adaptada: Battistuzzi, G. *et al. Arch. Biochem. Biophysics.* **2010**, 21–36.

¹²⁹ Análise realizada em colaboração com Prof. Dr. Fabio Cesar Gozzo/Dr. Eduardo Pilau (IQ-UNICAMP).

¹³⁰ Fenn, J. B.; *et. al. Science.* **1989**,246, 64.

¹³¹ Hoffman, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry.* **2002**.

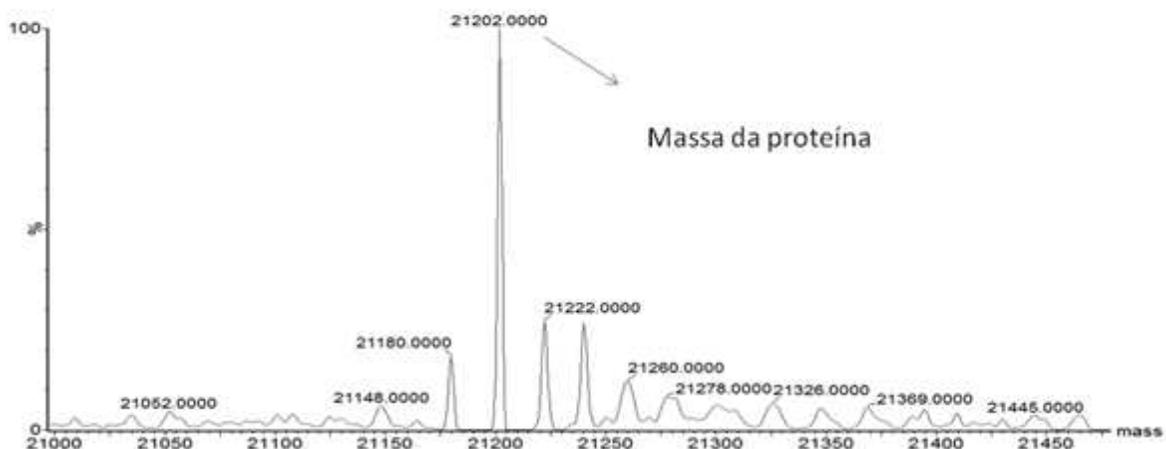


Figura 54. Espectro de massas (deconvoluido) da fração 10 que contém a proteína de interesse (ACN:H₂O (1:1), 0,1% HCOOH).

7.4.2. Estrutura primária da BsP315

Para identificação da sequência primária da BsP315 (frações 10 a 15 gel, Figura 51), através da metodologia “*Bottom-up*”, essa proteína foi extraída do gel (SDS-PAGE) e tripsinizada.¹³² Os peptídeos gerados foram separados por cromatografia líquida e analisados por espectrometria de massas LTQ-Orbitrap-XL (*Thermo Scientific*, Alemanha). O equipamento foi operado no modo de aquisição de dados independente alternando entre Orbitrap-MS e LTQ-MS-MS, e permitiu isolar de maneira sequencia-los íons mais intensos para a fragmentação no íon trap linear usando dissociação induzida por colisão (CID).^{133,134}

Os espectros de fragmentação dos peptídeos da BsP315 foram comparados com banco de dados [NCBI¹³⁵ (*National Center for Biotechnology Information*) e SwissProt], através do programa *Sequest* e da plataforma de dados do *Proteomic Discover*. A sequência primária de BsP315 sugerida com base no banco de dados de *Bacillus pumilus* revelou homologia de 36% com uma proteína de função desconhecida (Figura 55).^{136,137,138,139}

¹³² Kelleher, N. L.; *et. al. J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 806.

¹³³ Bogdanov, B.; Smith, R. D. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, 24, 168.

¹³⁴ Granvogl, B.; Ploscher, M.; Eichacker, L. A. *Anal Bioanal Chem.* **2007**, 389, 991-1002.

¹³⁵ Cantú, M. D.; Carrilho, E. *Quim. Nova.* **2008**, 31, 3, 669-675.

¹³⁶ Diamant, B. J.; Noble, W. S. *J. Proteom. Res.* **2011**, 10, 3871-3879.

```

MKKWFIVLSVSLTFVLMMLSSIPASAASPRHGAIIVTQTDEAKWSGISADIVLPKTATIKNGYADWYLGLG
SAVIESGISKTAGYKVFLLGSGSQGGSFYWNSEYDSSIKD GARVNLLKLNMGDGTVSLYUNGTLRKQP
IYKPSRLKRLDVFHMHVHGVDNGTNSYSQASFSNVQLRANTSGSVYKRWGSIKSSLLAKNL
ESGAAAPKFTVISSVPLSTSLSAQ

```

Figura 55. Análise realizada no programa *Proteomic Discover*, revelando, em verde, a cobertura dos peptídeos identificados com o banco de dados do *Bacillus pumilus* do NCBI. Legenda com a nomenclatura dos aminoácidos (Anexo 156).

Para melhorar a cobertura dos aminoácidos da BsP315 de *Bacillus safensis*, foi realizado o sequenciamento “De Novo”, através do programa *Peaks* 6.0. Esse programa constrói um espectro de massas teórico com as sequências dos aminoácidos, a partir dos espectros de massas (MS/MS), contendo os fragmentos dos peptídeos gerados por dissociação induzida por colisão (CID). O programa calculou e forneceu a melhor combinação possível para prever a sequência teórica dentre todas possíveis.^{140,141} Adicionalmente, esse programa permitiu introduzir possíveis mutações nas sequências de aminoácidos, trocando resíduos com a mesma funcionalidade na cadeia lateral. Com isso, foi possível obter uma cobertura de 84% aumentando a cobertura desta proteína (Figura 56).

¹³⁷ Site Nacional de Biotecnologia <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

¹³⁸ Instituto Suíço de Bioinformática <http://web.expasy.org/groups/swissprot/>

¹³⁹ Kinter, M.; Sherman, E.N. *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*. **2000**.

¹⁴⁰ Ma, B. *et. al. Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, 17, 2337-2342.

¹⁴¹ Steen, H.; Mann, M. *Nature Reviews*. **2004**, 5, 699.

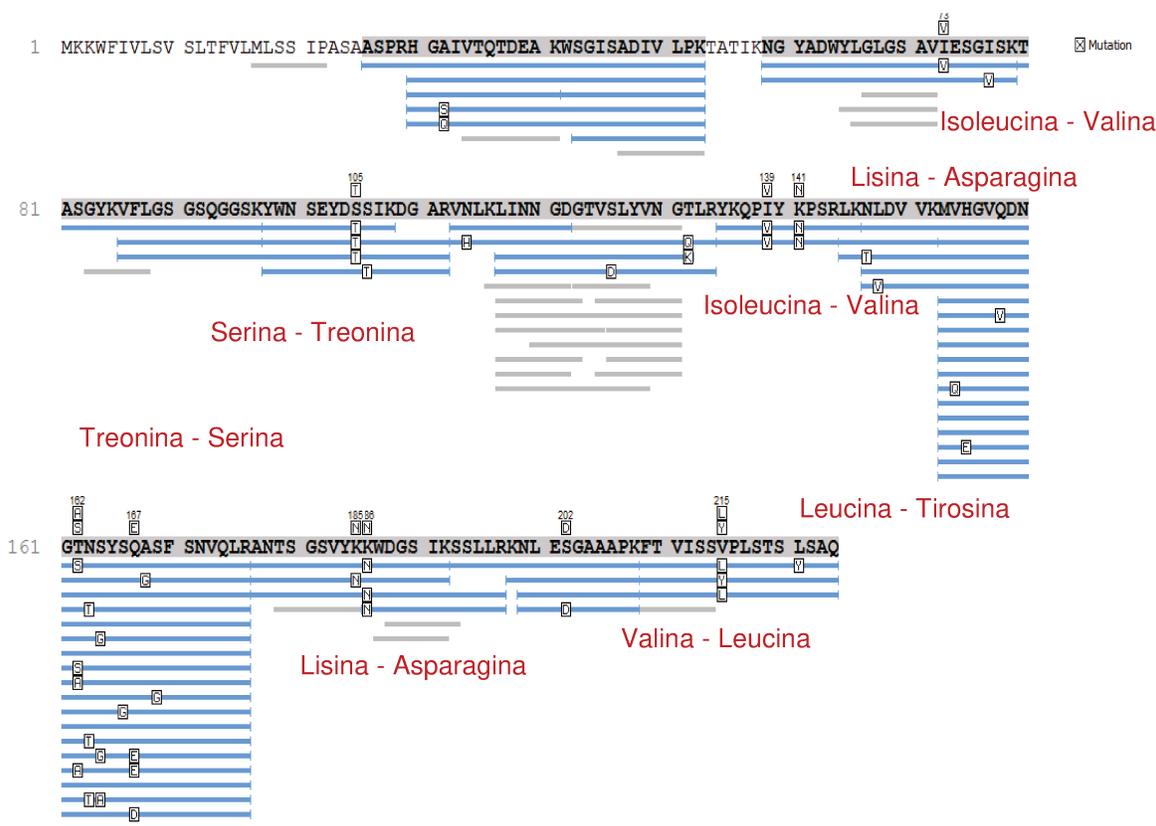


Figura 56. Sequência de aminoácidos, com mutações, obtidas a partir da análise de sequenciamento “De Novo” utilizando o programa *Peaks* 6.0. Legenda com a nomenclatura dos aminoácidos (Anexo 156).

7.5. Identificação e Estrutura Primária da BsCat

A BsCat detectada na fração 3, eluiu com outras proteínas de 14 a 116 kDa. Portanto as bandas contendo as proteínas foram excisadas do gel e tripsinizadas. Os peptídeos foram separados por cromatografia líquida e analisados por espectrometria de massas LTQ-Orbitrap-XL (*Thermo Scientific*, Alemanha). (Anexo 155). A busca no SwissProt através do *Sequest*, identificou uma catalase de *Bacillus pumilus* (SAFR-032) com 54% de homologia (Figura 57).

```

MTNSNHK NLT TNQGVVPGDN QNSRTAGHRG PTFDDYHU EKLAFDRER IPERVWHARG AGAYGVFEVE NSMEKHTKAA
FLSEDGKQTD VFVRFSTMH PKGSPETLRD PRGFAVKFYT EEGNYDLVGN NLPFFIRDA LKFPDMVHSL KPDVTNIQD
PDRYVDFMTL TPESTHMLTW LFSDEGIPAN YAEMRGGSMH TFRWVWKYGE TKYVKYHWRP SEGIRNLSME EAAEIQANDF
QHATRDLYDR IENGNYPAMD LYVQLMPLSD YDDLDDYPCD PTKTWSEEDY PLQVGRMTL NRPENFFAE TEQSFTPSA
LYPGIEASED KLLQGR LFSY PDTQRHRLGA NYMRIPVNCY YAPVHNNQQD GFMITTRPSG HINYEPRYD DQPKENPHYK
ESEQVLHDDR MYRQK EKPN DFKQAGENKYR SYSEEEKQAL IKNLTADLKD VNDKTKLLA CNFYRADEDY GQRLADSLGV
DIRSYLQGNM K
    
```

Figura 57. Análise realizada na plataforma do *Proteomic Discover*, através do programa *Sequest*, revelando uma catalase de *Bacillus safensis*. Em verde, a cobertura e os peptídeos identificados com o banco de dados NCBI (*Bacillus pumilus* SAFR-032). Legenda com a nomenclatura dos aminoácidos (Anexo 156).

8. CONCLUSÕES

A partir do *Bacillus safensis* CFA06, foi possível purificar e identificar a BsP315 uma metaloproteína de 21 kDa, contendo ferro e molibdênio. Essa enzima, não apresenta similaridade com nenhuma proteína com função conhecida em bancos de dados disponíveis na literatura.

Além dessa proteína, foi possível detectar e identificar, uma catalase BsCat de *Bacillus safensis*. Essa oxirredutase apresentou 54% de homologia com uma catalase de *Bacillus pumilus* SAR032.

Esse resultados motivaram o sequenciamento do genoma da cepa CFA06o qual foi concluído recentemente e depositado no banco de dados online (GOLD), facilitando a localização do gene responsável pela expressão da proteína BsP315. Foram iniciados os trabalhos no grupo de pesquisa da Profa. Anete Pereira de Souza (UNICAMP-CBMEG), para expressão heteróloga dessa proteína.

PARTE EXPERIMENTAL

9.1. Métodos Gerais

9.1.2. Solventes e reagentes

Todos os solventes empregados apresentavam grau analítico de pureza, os quais foram destilados ou bidestilados antes de serem utilizados. Os reagentes usados nas sínteses orgânicas foram adquiridos comercialmente e utilizados sem tratamento prévio, com exceção da piridina, que foi tratada com hidreto de cálcio e destilada imediatamente antes do uso.¹⁴² Para as análises de RMN foram utilizados clorofórmio e benzeno deuterado da Cambridge Isotope Laboratories.

9.1.3. Métodos cromatográficos e de espectrometria de massas

9.1.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises cromatográficas, do tipo preparativa em camada delgada (CCD), foram realizadas em placas de vidro 20 cm x 20 cm com 1 mm de espessura de sílica gel 60GF₂₅₄ (Merck) ativadas a 110 °C por 60 min. A revelação dos compostos foi realizada pela pulverização parcial, somente na borda da placa, utilizando solução reveladora de *p*-anisaldeído (*p*-anisaldeído, H₂SO₄, ácido acético e etanol na proporção de 1:2:1:100), seguida de aquecimento.

Para as análises de CCD analítica foram utilizadas folhas de alumínio Merck (10 x 2,5 cm), com indicador de fluorescência, cobertas com sílica gel. A visualização dos compostos foi realizada por irradiação com lâmpada UV 254nm, e pulverização com solução reveladora de *p*-anisaldeído, ácido fosfomolibdico (10% m/v de ácido fosfomolibdico em etanol) e/ou solução de dinitrofenilhidrazina

¹⁴² Perrin, D. D.; Amarego, W. L. F.; Perrin, D. R. *Purification of Laboratory Chemicals*, 2th Ed. 1980.

(2,4 difenilhidrazina em 100 mL metanol e 1 mL 36% HCl) com posterior aquecimento a 300 °C com pistola de ar quente.¹⁴³

9.1.3.2. Cromatografia em coluna (CC)

As purificações dos compostos sintetizados foram realizadas por cromatografia “flash” em coluna, sendo utilizada sílica gel 60 µm (ACROS – 0,035-0,070 mm com poros de 6 nm) como fase estacionária e solventes destilados como eluentes. As dimensões das colunas e o volume coletado nas frações eram adequados aos compostos a serem separados e seguiram as recomendações da literatura.¹⁴⁴ As frações coletadas foram comparadas por CCD e agrupadas por perfil de semelhança.

9.1.3.3. Cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC)

O equipamento utilizado para o processo de purificação foi um AKTA-FPLC (GE Healthcare, UK) Armersham Pharmacia FRAC-900, com fluxo de 1 mL·min⁻¹ e pressão máxima de 0,3 MPa. Foram utilizadas duas colunas distintas: HiTrap Q-FF e HiTrap SP-FF, ambas de 1 mL da Amersham Biosciences. O método foi desenvolvido no software Unicorn, com um volume de fração de 1 mL·min⁻¹. Análise foi realizada em colaboração com a Profa. Anete Pereira de Souza (CBMEG-UNICAMP).

9.1.3.4. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

As cromatografias gasosas acopladas a espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas em cromatógrafo *Agilent* 6890 acoplado a detector seletivo

¹⁴³ Collins, H. C.; Braga, L. G.; Bonato, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*. 2006.

¹⁴⁴ Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. J. *Org. Chem.* **1978**, 43, 14, 2923-2925.

de massas HP 5973, com ionização por impacto de elétrons (IE) de 70 eV, com varredura na faixa de m/z 40-400. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) com 5% de fenil-metilsiloxano para a separação dos compostos analisados. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C e o detector a 280 °C. As seguintes programações de temperatura foram empregadas:

Programa 1. Temperatura inicial da coluna 40 °C, com rampa de aquecimento de 4 °C·min⁻¹ até 290 °C, com pressão constante de 7,07 psi de He. Amostras injetadas com volume de 1 μL e no modo split (10:1).

Programa 2. Temperatura inicial da coluna 40 °C, com rampa de aquecimento de 10 °C·min⁻¹ até 290 °C, com pressão constante de 7,07 psi de He. Amostras injetadas com volume de 1 μL e no modo split (10:1).

Programa 3. Temperatura inicial da coluna 40 °C (durante 3 min) com rampa de aquecimento de 10 °C·min⁻¹, e 30 minutos isotermicamente a 290 °C. Com pressão constante de 7,07 psi de He. Amostras injetadas com volume de 1 μL (1 mg·mL⁻¹), no modo *split* (1:10).

Programa 4. Temperatura inicial da coluna 40 °C (durante 3 min) com rampa de aquecimento de 10 °C·min⁻¹, até 290 °C, com pressão constante de 7,07 psi de He. *Liner* (GC-EM) especial para dessorção dos compostos na fibra de SPME.

Programa 5. Temperatura inicial da coluna 40 °C (durante 3 min) com rampa de aquecimento de 10 °C·min⁻¹, e 20 minutos isotermicamente a 290 °C, com pressão constante de 7,62 psi de He. Amostras injetadas com volume de 1 μL , no modo *splitless*, sem a interferência de solventes. As demais foram diluídas em acetato de etila, até uma concentração aproximada de 1 mg·mL⁻¹, o volume de injeção foi de 1 μL *splitless*. Faixa de massa de 40-600 m/z .

9.1.3.5. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

9.1.3.5.1. LTQ-Orbitrap

Os peptídeos foram separados por cromatografia de troca reversa por HPLC acoplado ao espectrômetro de massas. A coluna utilizada foi *Reprosil C18* (0,075 X 150 mm). As corridas tiveram duração 90 minutos, gradiente de eluição de 0 a 95% solução contendo água, ácido fórmico (0,1% v/v) e acetonitrila com fluxo de 80 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Os peptídeos foram ionizados por nanoeletrospray e suas massas foram analisadas no espectrômetro de massas híbrido LTQ-Orbitrap-XL (Thermo Scientific, Alemanha).¹⁴⁵ As amostras foram preparadas na concentração de 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em metanol: água (4:1) e 0,1% de ácido fórmico. As análises foram realizadas com voltagem do spray = 1,5 kV, voltagem do capilar = 35 V, temperatura do capilar = 200 °C e *tube lens* = 100 V.¹⁴⁶

9.1.3.5.2. ESI-QTOF

Para a análise utilizando ESI(+)-QTOF-MS, a amostra contendo a proteína foi diluída para 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 1:1 com 0,1% de ácido fórmico. A amostra foi analisada por infusão direta da solução no instrumento utilizando uma bomba de seringa com fluxo de 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Os parâmetros utilizados foram voltagem do capilar de 3 KV, voltagem do cone 30 V, temperatura da fonte 100°C, temperatura de dessolvatação de 200 °C, fluxo gás do cone 30 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, fluxo gás de dessolvatação de 900 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, energias de colisão do Trap e Transfer em 6 e 4 V, respectivamente (QTOF-MS mode). Para calibração foi utilizada uma solução de ácido fosfórico, na faixa de m/z 90 a 2000.¹⁴⁷

¹⁴⁵ Xu, P.; Duong, D. M.; Peng, J. J. *Proteome Research*. **2009**,8, 3944-3950.

¹⁴⁶ Análise realizada em colaboração com o Prof. Francisco de Assis Machado Reis (IQ-UNICAMP).

¹⁴⁷ Análise realizada pelo Dr. Eduardo Pilau em colaboração Prof. Fabio César Gozzo (IQ-UNICAMP).

9.1.4. ICP-MS

A análise de espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado foi realizada em colaboração com o Prof. Marco Aurélio Zezzi Arruda e o Msc. Cícero Alves Lopes Júnior (IQ-UNICAMP).

A análise elementar foi realizada em frações purificadas do extrato proteico do micro-organismo. Alíquotas (100 µL) de cada fração foram transferidas para frascos de 10 mL e os volumes foram ajustados com solução aquosa HNO₃(1% v/v) de. A composição elementar foi realizada com ICP-MS (*Elan DRC-e*, *PerkinElmer*, Norwalk, CT, EUA), equipado com uma célula de colisão / reação, utilizando-se as condições de operação mostradas Tabela 8.

Tabela 8. Condições de funcionamento de Elan DRC-ICP e MS

Parâmetros instrumentais	
Câmara de spray	Ciclônica
Nebulizador	Meinhard®
RF power (W)	1241
Fluxo nebulização argônio (L·min ⁻¹)	0,90 - 0,93
Fluxo auxiliar argônio (L·min ⁻¹)	1,1
Medidas	
Modo de varredura	Espera de pico
Tempo de espera (ms)	50
Tempo de <i>delay</i> (ns)	60
Varreduras	6
Tempo de integração (ms)	63000
Replicatas	3
Monitoramento <i>m/z</i>	6 - 240

9.1.5. Cálculo dos índices de retenção

Os índices de retenção foram calculados analisando as amostras por CG-EM. Para análises dos voláteis de *Phloea subquadrata* e *Phloeophana longirostris* utilizou-se a Programação 1. As demais análises foram realizadas de acordo com

a Programação 2. O padrão de hidrocarbonetos, saturados lineares de C8 a C20 (Sigma-Aldrich) foi injetado de acordo com as Programações 1 e 2. Para o cálculo dos índices de retenção, foi utilizada a seguinte equação.¹⁴⁸

$$IR = 100 X (n + (N - n) \frac{ta - tn}{tN - tn})$$

Onde: n = número de carbonos do alcano que elui imediatamente antes de **a**

N = número de carbonos do alcano que elui imediatamente após **a**

ta = tempo de retenção do composto **a**

tn = tempo de retenção do alcano que elui imediatamente antes de **a**

tN = tempo de retenção do alcano que elui imediatamente após **a**

9.1.6. Espectroscopia de RMN

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Varian Inova – 500, operando a 499,89 MHz para o ^1H e 125,71 MHz para o ^{13}C , em espectrômetro Bruker Avance III-400, operando a 400,13 MHz para o ^1H e 100,61 MHz para o ^{13}C ou em espectrômetro Bruker Avance 250, operando a 250,13 MHz para o ^1H e 62,90 MHz para o ^{13}C . As amostras foram analisadas em tubos de ressonância de 5 mm de diâmetro. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em partes por milhão (ppm), tomando-se como padrão de referência interna tetrametilsilano (TMS, 0,0 ppm) ou o próprio solvente da solução.

Os espectros foram processados em estações de dados, utilizando o programa *VNMRJ*, para os experimentos realizados no espectrômetro Varian INOVA-500 e o programa *TopSpin 2.1*, para os experimentos realizados no espectrômetro Bruker Avance III 400. Os experimentos unidimensionais de RMN de ^1H e de ^{13}C foram realizados utilizando as condições típicas pré-definidas nos *softwares* dos equipamentos. Espectros de RMN de ^{13}C de DEPT 135°, DEPT 90°

¹⁴⁸ Dool, H.V.D.; Kratz, P.D. *J. Chromatography*. **1963**, 463-471.

e de duas dimensões (HSQC) foram utilizados para elucidação estrutural de compostos.

9.1.7 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho e UV-Visível

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro IV Espectrofotômetro Thermo Scientific Nicolet 380 FT-IR Smart Performer, com transformada de Fourier. As medidas de fluorescência foram realizadas em leitor de fluorescência Flashscan 530 Analytic Jena, utilizando filtro de excitação de $\lambda_{ex} = 365$ nm e leitura de emissão à $\lambda_{em} = 460$ nm. Além desses, o espectrofotômetro de absorção UV-Visível HP8453, institucional, também foi utilizado.

9.1.8 Lupa estereoscópica

Foi utilizada a lupa estereoscópica binocular para observações, registros e dissecação das estruturas dos insetos.¹⁴⁹

9.1.9 Microscopia eletrônica de varredura

As análises foram realizadas no equipamento institucional (IQ-UNICAMP), *Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JMS 6360-Lv microssonda RaioX*. O material biológico (antenas) foi retirado com auxílio de lupa estereoscópica, montado no porta-amostra do microscópio (*stubs*) sobre uma fita adesiva com cola condutora.¹⁵⁰ A antena foi recoberta por uma fina camada de ouro, através do processo de "sputtering". O eletrodo de ouro é ligado ao potencial negativo de uma fonte de tensão da ordem de 1 a 2 KV. Os íons positivos são produzidos pela ionização do argônio, injetado na câmara de descarga. Em seguida, as amostras foram imediatamente imageadas.¹⁵¹

¹⁴⁹ Trabalho realizado no laboratório do Prof. Paulo Cesar Munir de Lacerda Miranda (IQ-UNICAMP).

¹⁵⁰ Silva, C.A.; *et. al. Micron*. **2010**, 41, 289-300.

¹⁵¹ Castro, L., A. S. C. *Embrapa Clima Temperado*. **2001**.

9.2. Métodos Específicos–Capítulo I

9.2.1. Coleta de material

As coletas dos indivíduos (*Phloea subquadrata* e *Phloeophana longirostris*) foram realizadas, ao longo dos anos de 2010, 2011 e 2012. Os locais de coleta foram: Reserva Municipal da Serra do Japi (Jundiaí, SP); Parque Municipal do Itapetinga, Atibaia e Campus da Universidade de São Paulo (USP) em São Paulo. As espécies de plantas: *Eugênia aculata*, *Plínia cauliflora*, *Eugênia sp.*, *Eugênia blastanta*, *Eugênia neoverrugosa*, *Myrciaria floribunda var. vermelha* e *Myrciaria floribunda var. branca*, foram coletadas na Serra do Japi (Jundiaí, SP), no primeiro semestre de 2011. Todo o material biológico estudado nesse capítulo foi coletado e ou cedido pela Msc. Adriana T. Salomão e Prof. João Vasconcelos Neto, ambos do IB-UNICAMP.

9.2.2. Preparo do extrato total dos insetos

Indivíduos de *Phloea subquadrata* foram anestesiados em freezer a -20 °C, por 20 minutos, transferidos para um almofariz de porcelana e macerados em nitrogênio líquido até completa pulverização. Foram adicionados de 3 mL de acetato de etila bidestilado até completa extração dos compostos. Os extratos obtidos foram filtrados em algodão tratado, transferidos para frascos de vidro com batoque e armazenados no freezer até análise (Esquema 7). Os extratos foram analisados por CG-EM de acordo com o Programa 3.



Esquema 7. Esquema de análise para identificação dos compostos presentes no extrato corpóreo de *Phloea subquadrata*.

9.2.2.1. Quantificação dos compostos do extrato total de *Phloea subquadrata*

Foram obtidas curvas de calibração para o (*E*)-2-hexenal (**10**), decano (**24**), (*E*)-2-octenal (**32**), acetato de (*E*)-2-hexenila (**28**), undecano (**37**) e o dodecano (**42**). Cada curva considerou seis níveis de concentração injetados em ordem crescente, as quais variaram entre 0,04 a 4,00 mg·mL⁻¹, dependendo da abundância dos compostos na glândula do inseto. Os padrões foram injetados na concentração de 1 mg·mL⁻¹ no CG-EM, de acordo com o Programa 3.

As soluções padrões foram obtidas por diluições de padrões comerciais e as injeções foram feitas em triplicatas utilizando o dodecanal (0,248 mg·mL⁻¹) como padrão interno. Os valores obtidos foram convertidos em (mg do composto)/(mg do inseto).

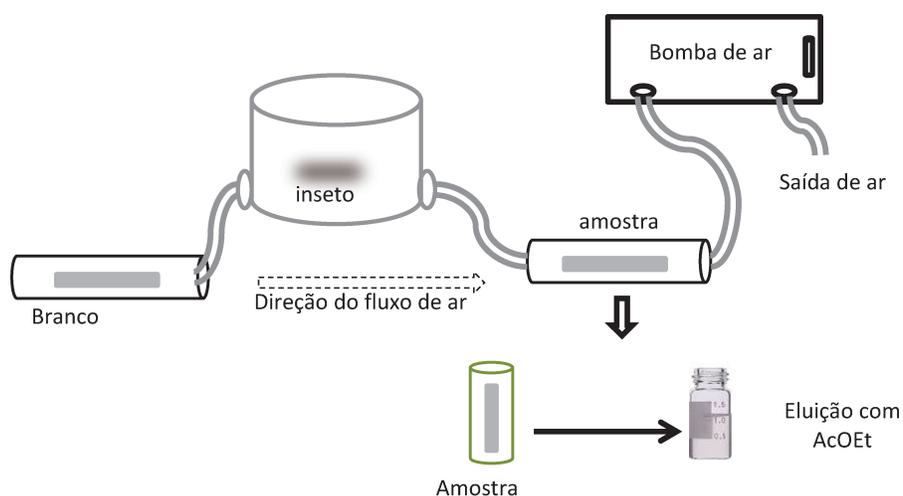
Os gráficos foram construídos representando a (área do pico do composto de interesse/área do pico do dodecanal) *versus* (concentração do composto de interesse/concentração fixa de dodecanal) e a equação da reta ($Y = a.X$) foi obtida por regressão linear utilizando o programa Origin 6.0[®]. O coeficiente de correlação (R^2) forneceu uma estimativa da qualidade da curva obtida, ou seja, quanto mais perto de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais. Fatores respostas (FR) foram calculados pelo inverso do coeficiente angular da reta de calibração ($FR = 1/a$) (Tabela 1).

9.2.3. Análise dos compostos voláteis

9.2.3.1. *Headspace* dinâmico

Os compostos voláteis dos indivíduos de *Phloea subquadrata*, foram coletados em cartuchos, contendo 300 mg da resina Porapak-Q[®] 80-100 mesh,

previamente ativados.¹⁵² Cada inseto foi analisado de maneira individual, em campânula de vidro durante 2 horas, sob um fluxo de ar ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), de maneira ininterrupta. Um cartucho foi colocado antes da entrada de ar na campânula de maneira que todas as impurezas do ar ficassem retidas (branco). Posteriormente, a eluição dos compostos adsorvidos na resina e no branco foram realizados com 2 mL de acetato de etila bidestilado e concentrado para 1 mL em fluxo de argônio (Esquema 8). As análises foram realizadas por CG-EM, de acordo com o Programa 4.

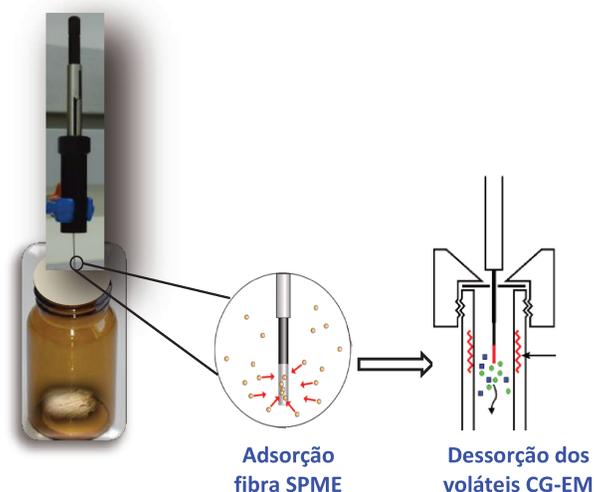


Esquema 8. Modelo de funcionamento do *headspace* dinâmico utilizando a resina Porapak-Q®.

9.2.3.2. Microextração em fase sólida (SPME)

Para análise dos compostos voláteis por SPME, um mesmo inseto foi analisado sobre duas condições fisiológicas: em repouso e após estímulo físico. O estímulo foi aplicado, sobre a região dorsal, com auxílio de um bastão de vidro (Esquema 9).

¹⁵² Agelopoulos, N. G.; Pickett, J. A. *J.Chem. Ecol.* **1998**, *24*, 7.



Esquema 9. Sequência de análise para coleta dos voláteis por SPME.

Em ambas as condições (repouso e após estímulo), o tempo de adsorção dos compostos à fibra foi de 20 minutos, a uma temperatura de 20 °C (Tabela 9).

Tabela 9. Parâmetros referentes as análises dos voláteis por CG-EM/SPME

Variáveis	Tipo/Condições
Tipo de revestimento da fibra	Carboxen-PDMS
Tamanho da fibra	75µm
Tipo de extração	“headspace”
Tempo de equilíbrio	60 segundos
Tempo de exposição à fibra	20 minutos
Temperatura análise	20°C
Temperatura de dessorção no CG-EM	250°C
Tempo de dessorção no CG-EM	10 minutos

A dessorção dos voláteis foi realizada no CG-EM a 250 °C por 10 minutos, com programação de temperatura de acordo com o Programa 4. A mesma programação foi utilizada para a limpeza da fibra antes de iniciar as análises com os insetos (controle).

9.2.4. Análises do conteúdo das glândulas metatorácicas e abdominais

O conteúdo glandular foi obtido por três métodos distintos: retirada do conteúdo glandular com microseringa, pressão abdominal e análises das exúvias. Esses métodos variaram de acordo com o estágio de vida do inseto. Para os adultos foi realizada a retirada direta do líquido glandular com auxílio de uma microseringa, após a dissecação do inseto (Figura 58).¹⁵³



Figura 58. A: Glândula metatorácica do macho de *Phloea subquadrata* e retirada do conteúdo com auxílio de uma microseringa.

A análise das glândulas abdominais dorsais foi realizada através do extrato obtido pela maceração de exúvias recém-coletadas no campo. As exúvias foram maceradas em 600 μL de solvente, filtrado em algodão e armazenados em freezer -20°C .

Outra técnica utilizada para a retirada do conteúdo glandular foi a compressão da região ventral dos insetos. O líquido liberado foi embebido em algodão tratado e lavado com 3500 μL de acetato de etila bidestilado. A mistura foi concentrada em fluxo de nitrogênio até o volume de 1000 μL . A análise por CG-EM foi de acordo com o Programa 5.

A identificação dos compostos presentes na glândula foi realizada através da comparação dos espectros de massas obtidos na análise por CG-EM com os

¹⁵³ Trabalho de dissecação realizado pela Msc. Adriana T. Salomão, IB-UNICAMP.

da biblioteca *Wiley 275*. Além disso, as estruturas dos constituintes químicos majoritários foram confirmadas pelos índices de retenções relativos.

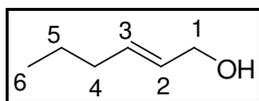
9.2.5. Voláteis das plantas

Galhos e troncos das plantas, utilizados por indivíduos de *Phloea subquadrata*, foram coletados e conduzidos ao laboratório no IQ-UNICAMP. O material vegetal foi cortado transversalmente e transferido (1 g) para frascos de vidros, tampados com batoque e armazenados em freezer a -20°C .

Para análise dos voláteis por CG-EM/SPME, 1g do material vegetal a ser analisado foi transferido para o frasco de análise SPME e deixado fechado, em banho-maria a 40°C por 30 minutos. Após esse tempo, a fibra de SPME (Carboxen-PDMS 75 μm) foi exposta por 10 minutos e transferida para o injetor do CG-EM para dessorção dos compostos. A dessorção dos voláteis no CG-EM foi a 250°C por 10 minutos. Foi utilizado o Programa 4 de temperatura para as análises e limpeza da fibra.

9.2.6. Procedimentos sintéticos

9.2.6.1. Síntese do (*E*)-2-hexenol



A um balão de fundo redondo (20 mL) contendo metanol (5 mL) e sob agitação foram adicionados hidróxido de potássio (140mg) e acetato de (*E*)-2-hexenila (710 mg, 5 mmol). A mistura reacional foi mantida por 1 h à temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando acetato de etila (3 x 5 mL), seguido da lavagem com solução saturada de bicarbonato de sódio. A mistura resultante foi purificada em coluna de sílica gel, utilizando acetato de etila: hexano

(2:8 v/v) como eluente. As frações com perfil químico semelhante foram agrupadas e concentradas cuidadosamente em evaporador rotativo. Foi obtido 339 mg do produto representando um rendimento de 47%. A identidade do produto foi confirmada através das análises por CG-EM e RMN de ^1H e ^{13}C .

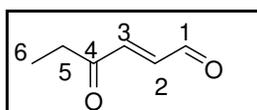
RMN de ^1H (CDCl_3 , 250 MHz TMS) δ : 0,91 (H-6, 3H, t, J 7,2 Hz); 1,39 (H-5, 2H, s, J 7,2 Hz); 1,64 (H-1, 1H, s); 2,05 (H-4,m, 2H); 4,09 (H-1, 2H, d); 5,56 (H-2, 1H, dt, 1J 15,5Hz e 2J 6,7); 5,67 (H-3, 1J 1H, 15,5Hz e 2J 6,7).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 250 MHz) δ : 13,8 (C6), 22,4 (C5), 34,5 (C4); 64 (C3), 129,2 (C2), 133,5 (C1) ppm.

Rf: 0,38

EM: m/z 100(M^+ , 2), 81(25), 67(20), 57(100), 41(38)

9.2.6.2. Síntese do (*E*)-4-oxo-2-hexenal



Em um balão de fundo redondo (50 mL) foi preparada uma mistura de THF/acetona/água na proporção de 10:8:2 (v/v) sob agitação e em banho de gelo a $-15\text{ }^\circ\text{C}$ (etanol/gelo seco). Posteriormente, foram adicionados 2-etilfurano (1,1 mL, 10 mmol), seguido de NBS recristalizado¹⁵⁴ (2,72 g, 15 mmol) e piridina (1,6 mL, 20 mmol). O controle da temperatura ($-15\text{ }^\circ\text{C}$) foi mantido rigorosamente durante 3 horas. Após esse período, foi retirada uma alíquota (700 μL) para a caracterização do produto cinético, e a reação permaneceu em agitação e a temperatura ambiente por 12 h. A reação foi finalizada pela adição de HCl (0,5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 20 mL) e a extração com éter etílico (3X 20 mL). A fase orgânica foi lavada com solução supersaturada de cloreto de sódio e seca com Mg_2SO_4 anidro. O solvente foi removido por destilação. O óleo amarelado obtido foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel e usando como sistema eluente pentano/éter 85:15 (v/v). O éter etílico foi removido por destilação, e o produto resultante foi

¹⁵⁴ Dauben, H. J.; McCoy, L. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4863-4873.

submetido à análise por CG-EM e RMN de ^1H e ^{13}C (0,35 g, 35%)¹⁵⁵. Uma segunda purificação foi realizada através de cromatografia em camada delgada preparativa (CCD) em cubas de vidro contendo mistura de pentano: éter 85:15 (v/v) como fase móvel. A região da placa que continha o composto de interesse foi retirada da placa e transferido para um béquer contendo pentano/éter 85:15 (v/v) por 30 minutos em agitação. Após esse tempo, essa mistura foi filtrada, concentrado em fluxo de nitrogênio e analisada por CG-EM (Programa 3).

RF:0,24.

IV (neat): 2981, 2941, 1693, 1120, 1058, 981, 765, cm^{-1} .

EM: m/z 112 (M^+ , 16); 97 (2); 84 (15); 83(100); 57 (18); 55 (77); 53 (10).

9.2.6.3. Confirmação estrutural do (*E*)-4-oxo-2-hexenal por co-injeção

As amostras das secreções de glândulas de *Phloea subquadrata* foram diluída em acetato de etila e co-injetadas em CG-EM com uma solução sintética de (*E*)-4-oxo-2-hexenalsintético na concentração de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em acetato de etila, misturadas na proporção de 1:1.

9.2.7. Análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA)

O mesmo padrão de compostos foi observado em todos os espectros obtidos por CG-EM/SPME para indivíduos de uma mesma classe. Para indivíduos de classes distintas, diferenças significativas no perfil cromatográfico puderam ser observadas. Para facilitar e sistematizar a interpretação dos resultados obtidos, análises multivariadas foram utilizadas como forma de: *i*) permitir a classificação dos indivíduos e *ii*) selecionar os compostos significativos nesta discriminação.

¹⁵⁵ Moreira, J. A.; Millar, J. G. *J. Chem. Ecol.* **2005**,31, 956-968.

9.2.7.1. Pré-processamento

Os cromatogramas obtidos foram avaliados individualmente para verificar desvios da normalidade, como: contaminantes majoritários, picos excessivamente alargados, baixa abundâncias entre outros. Em seguida, os cromatogramas foram submetidos à integração automática, no software MSD *ChemStation* (E.01.00.237, *Agilent Technologies*) o qual considerou todos os picos com uma abundância maior que 0,01%. Os compostos foram então alinhados com base no tempo de retenção. A abundância relativa de cada pico cromatográfico foi utilizada nas análises quimiométricas após cálculo do logaritmo e centragem na média. O logaritmo das abundâncias relativas foi utilizado na construção dos modelos quimiométricos como forma de evitar a supervalorização dos compostos majoritários, os quais podem não ser os compostos mais representativos na classificação das amostras. As análises quimiométricas foram realizadas no software Pirouette (v3.11, Infometrix) e os gráficos construídos no software Origin 6.0[®].

9.3 MÉTODOS ESPECÍFICOS – CAPÍTULO II

9.3.1. Procedimentos gerais adotados no laboratório de biocatálise

Todos os meios de cultura, soluções e materiais a serem utilizados em contato direto com os micro-organismos foram esterilizados a 121 °C, 1,5 Pa, por 15 minutos em autoclave. Soluções de álcool 70% (v/v) e hipoclorito 1% (v/v) foram utilizadas para desinfetar bancadas de trabalho e fluxo laminar. A manipulação dos micro-organismos foi sempre realizada em câmara de fluxo laminar. Todos os materiais e meios que tiveram contato direto com os micro-organismos foram autoclavados antes de serem descartados.

9.3.2. Micro-organismo *Bacillus safensis*

O micro-organismo *Bacillus safensis* foi isolado pelo Msc. Célio Fernando F. Angolini (IQ-UNICAMP) de uma amostra de petróleo biodegradado, da Bacia Potiguar, Rio Grande do Norte, Brasil. O cultivo foi realizado em placas de Petri contendo meio de cultura GYM (extrato de malte, extrato de levedura e glicose) e incubado em B.O.D. (modelo MA 415, Marconi). A preservação das cepas foi realizada utilizando duas técnicas distintas: liofilização e criopreservação.¹⁵⁶

9.3.3. Preparo do meio de cultivo

O meio de cultivo GYM, líquido, foi preparado a partir de glicose (4 g), extrato de levedura (4 g), extrato de malte (10 g) em água destilada (1 L). Para o preparo do meio sólido foi adicionado carbonato de cálcio (2 g) e ágar (20g).

¹⁵⁶ Uzunova-Doneva, T.; Donev, T. *J. Cult. Collect.* **2005**, 4, 17-28.

9.3.4. Coloração de Gram

Foi realizada a técnica de coloração de Gram segundo o protocolo Sociedade Americana de Microbiologia¹⁵⁷. Uma gota de água destilada estéril foi adicionada a uma lâmina de vidro dentro do fluxo laminar. Com auxílio de uma alça de platina uma pequena quantidade do micro-organismo foi adicionada a essa lâmina para confecção do esfregaço. Após, a lâmina foi corada com cristal violeta por 60 segundos e lavada com água destilada. Gotas de lugol foram adicionadas até cobrir toda a região com o esfregaço e deixado por 60 segundos e lavada logo em seguida com água destilada. Para ser descorada foi utilizado álcool etílico (95% por 10 segundos) seguido de um fino esguicho de água destilada. O último corante aplicado foi a safranina, por 60 segundos, e lavada com água destilada. Após a secagem, a lâmina foi levada ao microscópio onde foi possível verificar a presença de bacillus de coloração roxa indicando ser uma bactéria Gram (+).

9.3.5. Ensaios de triagem para detecção de monoxigenases

O micro-organismo *Bacillus safensis* foi cultivado em meio GYM sólido em placas de Petri. Após o período de crescimento, as células foram transferidas para *Eppendorf* estéril, sendo pesadas e suspensas em tampão borato pH 8,8 e posteriormente diluídas para uma concentração final de 0,2 mg·mL⁻¹. As reações foram realizadas em placas de polipropileno de 96 poços, sendo os ensaios e controles realizados em duplicata, utilizando os substratos **122**, **124**, **126** e **128**, com seus respectivos produtos da seguinte maneira:

Ensaio: suspensão celular *Bacillus safensis* (100 µL, 0,2 mg·mL⁻¹), BSA (80 µL, 5,0 mg·mL⁻¹), substrato (10 µL, 2 mmol·L⁻¹) e tampão borato (10 µL 20 mmol·L⁻¹, pH 8,8).

¹⁵⁷ Smith, C.A.; Hussey, A. M. *Gram Stain Protocols*. 2011.

Controle positivo: suspensão celular *Bacillus safensis* (100 μL , 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), BSA (80 μL , 5,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), produto do substrato (10 μL , 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e tampão borato (10 μL , 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8,8).

Controle negativo: BSA (80 μL , 5,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), substrato (10 μL , 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e tampão borato (110 μL , 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8,8).

Controle microbiano: suspensão celular *Bacillus safensis* (100 μL , 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), BSA (80 μL , 5,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) tampão borato (20 μL , 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8,8).

9.3.5.1. Solução tampão borato (ácido Bórico-bórax)

Inicialmente, foram preparadas soluções estoque de H_3BO_3 (0,2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), dissolvendo-se (1,24 g) em água destilada (100 mL), e de bórax (0,05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$) dissolvendo-se (1,91 g) em água destilada (100 mL). A solução tampão desejada foi preparada através da adição de volumes aproximados da solução de bórax (Tabela 10), a 25 mL da solução de H_3BO_3 . A solução obtida foi então diluída para um volume de 100 mL. Os valores de pH foram ajustados em pHmetro (pH 300 M Analyser).

Tabela 10. Solução Tampão ácido bórico-bórax

Solução bórax 0,05 $\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$	pH	Solução bórax 0,05 $\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$	pH
1,0	7,6	11,0	8,7
1,5	7,8	15,0	8,8
2,5	8,0	21,0	8,9
3,7	8,2	30,0	9,0
6,0	8,4	42,0	9,1
9,0	8,6	58,0	9,2

9.3.5.2. Preparo das soluções de substratos fluorogênicos

Inicialmente foram preparadas as soluções estoque na concentração de $20\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em acetonitrila dos substratos **122**, **124**, **126** e **128** e dos seus respectivos produtos **123,125**, **127** e **129**. Estes compostos foram previamente sintetizados pelo grupo da Professora Anita J. Marsaioli (IQ-UNICAMP) (Figura 59).

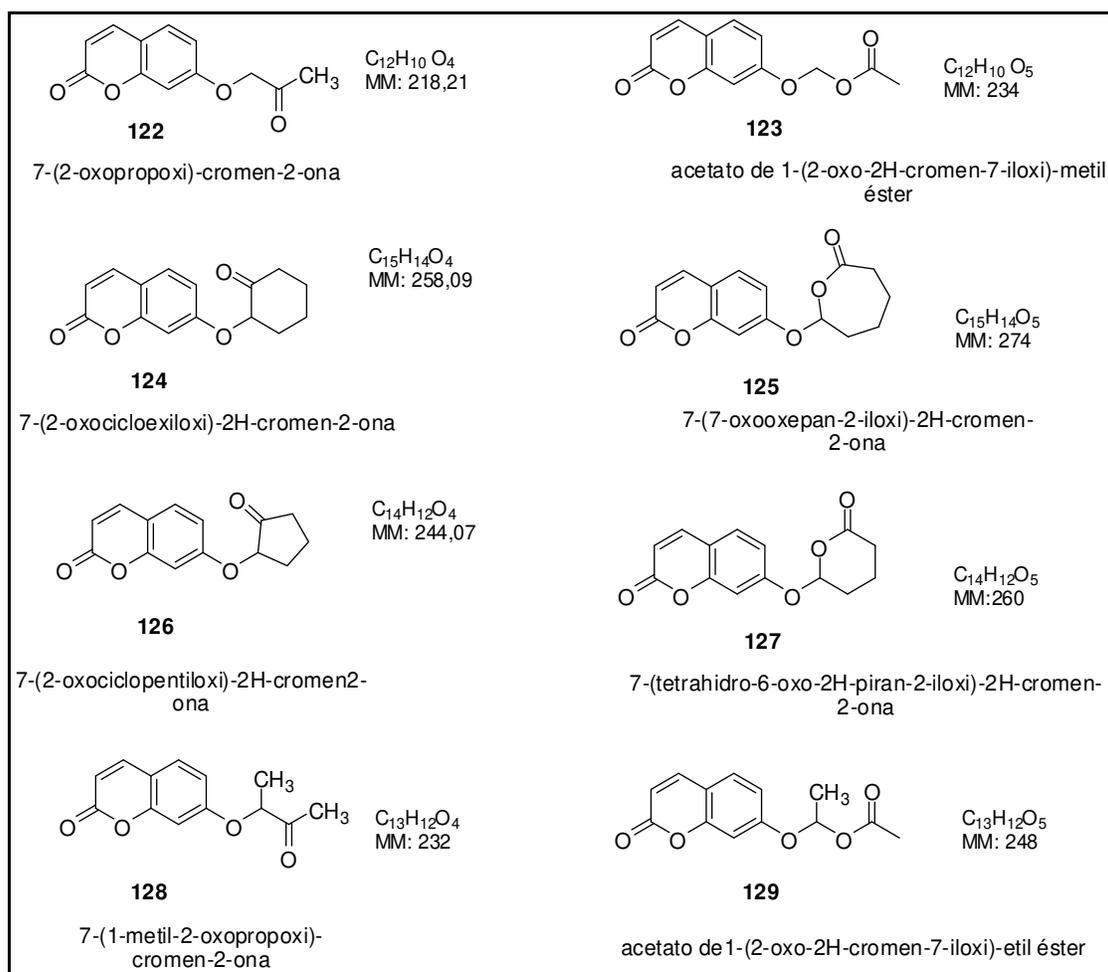


Figura 59. Substratos fluorogênicos e seus respectivos controles.

As soluções estoques foram posteriormente diluídas para $2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1, v/v), que constitui a solução de trabalho.

9.3.5.3. Solução de albumina de soro bovino (BSA)

Para o preparo da solução de BSA ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram pesados 0,005 g de BSA e solubilizados em tampão borato (1 mL , $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8,8).

9.3.5.4. Solução de NADPH

A solução a $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi preparada solubilizando o NADPH (7,43 mg) em tampão borato ($2,5 \text{ mL}$; $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; pH 8,8).

9.3.5.5. Solução de NADH

A solução a $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi preparada solubilizando o NADPH (6,63 mg) em tampão borato ($2,5 \text{ mL}$; $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; pH 8,8). A solução foi preparada no momento do uso para evitar qualquer alteração no cofator.

9.3.5.6. Solução de NAD

A solução a $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi preparada solubilizando o NADPH (6,85 mg) em tampão borato ($2,5 \text{ mL}$; $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; pH 8,8). A solução foi preparada no momento do uso para evitar qualquer alteração no cofator.

9.3.6. Preparo do extrato solúvel

O micro-organismo *Bacillus safensis*, foi inoculado em meio de cultivo GYM (3 L) durante 3 dias. As células foram centrifugadas a 4°C durante 15 minutos a 5000 rpm com *break* máximo. Para cada 25 mL do inóculo centrifugado, os pellets foram resuspensores em 32 mL de distintos tampões, sendo o fosfato de sódio ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,6 troca catiônica) e tampão Tris-HCl ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,6 troca aniônica). A esses tampões foram acrescentado o inibidor de protease PMSF (0,320

mL, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), β -mercaptoetanol (0,128 mL, $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), EDTA (0,064 mL, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e o agente redutor DTT ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Após a ressuspensão dos pellets, as amostras foram submetidas ao processo de sonicação em um equipamento *Cole Parmer 4710*, EUA. As condições foram potência 6 em 8 ciclos de 60 segundos (60 % *duty cycle*) com o intervalo de 2 minutos entre cada sonicação para permitir o resfriamento da amostra. Após o processo de sonicação o extrato formado foi centrifugado 2 x durante 40 minutos a 4°C a 12500 rpm. O pellet foi descartado e o sobrenadante recolhido para análise. Para o ensaio na presença do fenantreno, os ensaios respeitaram as mesmas condições, porém acrescido de 0,1g de fenantreno ao inóculo.

9.3.7. Purificação das proteínas

O equipamento utilizado para o processo de purificação foi um AKTA-FPLC (GE Healthcare, UK) Armersham Phamacia FRAC-900. A parte solúvel do extrato bruto foi submetida ao processo cromatográfico com duas colunas distintas (uma para a troca aniônica e a outra para troca catiônica). As frações coletadas foram refrigeradas a -8°C por 24 horas e submetidas ao ensaio de atividade HTS e analisadas em gel de SDS-PAGE (Figura 60).



Figura 60. A: equipamento FPLC. B: frações coletas após a purificação. C: colunas de troca aniônica e troca catiônica.

9.3.7.1. Troca catiônica

O extrato pós-centrifugação em tampão fosfato foi purificado com coluna HiTrap SP HP de 1 mL (GE Healthcare) acoplada ao aparelho AKTA-FPLC. O sistema foi equilibrado com 10 mL de tampão A (fosfato de sódio 50 mmol·L⁻¹ pH 7,6) e a seguir passou-se o extrato protéico, coletando-se o *flow through*.¹⁵⁸ A resina foi lavada com 10 mL de tampão A (para retirar ligações inespecíficas) e, por fim, executou-se um gradiente de eluição com tampão B (fosfato de sódio 50 mmol·L⁻¹ pH 7,6 e NaCl 1 mol·L⁻¹) de a 0% a 100 % em 30 volumes de coluna, ou seja, 30 mL de tampão B, coletando-se as frações a cada 1 mL.

9.3.7.2. Troca aniônica

A troca aniônica realizada em foi coluna HiTrapQ HP de 1 mL (GE Healthcare) e as fases móveis, foram os tampões Tris-HCl (50 mmol·L⁻¹ pH 7,6 eluente A) e Tris-HCl(50 mmol·L⁻¹ pH 7,6 com NaCl 1 mol·L⁻¹, eluente B). A resina foi equilibrada com 10 mL do eluente A, seguida da conexão de um *superloop* ao FPLC que permitiu a injeção do extrato solúvel. A coleta das frações se iniciou com o *flow through*, lavando-se a coluna com 10 mL de eluente A. O gradiente de eluição foi iniciado com o tampão B de 0% a 100 % coletando 1 mL das frações a cada minuto.

9.3.7.3. Tampão Tris-HCl (50 mmol·L⁻¹; pH 7,6)

O tris (hidroximetil) aminometano (6,05 g) foi solubilizado em água ultra-pura (1L) e o pH foi ajustado para 7,6 com solução de HCl (6 mol·L⁻¹) sob agitação. Para o preparo do tampão B, cloreto de sódio (14,61 g) foi adicionado ao tampão Tris-HCl (500 mL, 50 mmol·L⁻¹ pH 7,6) previamente preparado.

9.3.7.4. Tampão fosfato de sódio (50 mmol·L⁻¹; pH 7,6)

¹⁵⁸ *Flow through* é a parte do extrato solúvel que não interage com a coluna.

Foi preparada uma solução de fosfato monobásico de sódio (500 mL, 50 mmol·L⁻¹) e de fosfato dibásico de sódio (500 mL, 50 mmol·L⁻¹). Para o preparo do tampão, foi adicionado a solução de fosfato dibásico de sódio 50 mmol·L⁻¹ à solução de fosfato monobásico 50 mmol·L⁻¹ até se obter o valor desejado de pH 7,6. Para o preparo tampão B, adicionou-se cloreto de sódio (14,61 g) ao tampão fosfato (250 mL, 50 mmol·L⁻¹ pH 7,6) previamente preparado.

9.3.8. Triagem das frações do extrato proteico purificado

Ensaio: substrato **122** (10 µL, 2 mmol·L⁻¹), NADH (10 µL, 4 mmol·L⁻¹), NADPH (10 µL, 4 mmol·L⁻¹), NAD (10 µL, 4 mmol·L⁻¹), BSA (110 µL, 5 mg·mL⁻¹) e fração (50 µL)

Controle Positivo: produto do substrato **123** (10 µL, 2 mmol·L⁻¹), NADH (10 µL, 4 mmol·L⁻¹), NADPH (10 µL, 4 mmol·L⁻¹), NAD (10 µL, 4 mmol·L⁻¹), BSA (110 µL, 5 mg·mL⁻¹) e fração (50 µL).

Controle fração: substrato **122** (10 µL, 2 mmol·L⁻¹), BSA (160 µL, 5 mg·mL⁻¹) NADH (10 µL, 4 mmol·L⁻¹), NADPH (10 µL, 4 mmol·L⁻¹) e NAD (10 µL, 4 mmol·L⁻¹)

Após a montagem das microplacas, elas foram colocadas no shaker a 28°C. Após 24, 56 e 72 horas de reação as intensidades de fluorescência foram detectadas no equipamento *Flashscan 530 Analytic Jena Scan* e os valores obtidos foram convertidos em percentual de conversão. O tratamento dos dados foi feito pela diferença entre a média dos valores de intensidade de fluorescência dos ensaios com frações provindas da purificação (F) e média dos valores de intensidade de fluorescência emitidos pelos controles negativo (CN) e pelo controle da fração (CF). A razão entre esse valor e o controle positivo (CP) corresponde ao valor em porcentagem conforme a Equação 2.

$$\%Convers\tilde{a}o = \frac{F - CN - CF}{CP} \times 100$$

9.3.9. Verificação da presença do grupo heme

Foram colocados em uma cubeta de vidro (1 mL) as frações a serem analisadas juntamente com ditionito de sódio. Foi feito um branco, constituído de tampão fosfato de sódio (50 mmol·L⁻¹; pH 7,6) para frações provenientes da troca catiônica e tampão Tris-HCl (50 mmol·L⁻¹; pH 7,6) para frações da troca aniônica, sendo colocadas em outra cubeta de mesmo volume.

Antes das frações serem borbulhadas com CO, elas foram submetidas à leitura no espectrofotômetro. O monóxido de carbono foi borbuhlado durante 1 minuto na fração contendo ditionito de sódio, e em seguida, foi realizada a leitura da absorvância em um espectro de varredura.¹⁵⁹

9.3.10. Teste qualitativo para catalase

As frações purificadas através da troca iônica e as células íntegras do micro-organismo *Bacillus safensis* foram testados frente à presença da enzima catalase. Para esse teste, a solução peróxido de hidrogênio (200 µL), foi adicionada sobre a placa contendo o micro-organismo e sobre as frações.^{160,161}

9.3.11. Eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-PAGE)

Cerca de 50 µL de cada amostra foi aplicado em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. A corrida foi realizada na cuba vertical MidiGel (*Appellex*) a 150 V por 2 horas. O padrão de massa molecular (*Fermentas*) foi utilizado como parâmetro de massa molecular. Após o término da corrida, o gel foi corado em solução de

¹⁵⁹ Sawayama, A. M., et. al. *Chem. Eur. J.* **2009**. doi: 10.1002/chem.200900643

¹⁶⁰ Li, Y.; Schellhorn, H. E. *J. Biomol. Tech.* **2007**, 185-187.

¹⁶¹ Health Protection Agency. *Catalase Test National Standard Method.* **2010**, 2-9.

Coomassie Blue (0,25 %) por 40 minutos e descorado em solução descorante (metanol e ácido acético) até a completa descoloração do gel e o aparecimento das bandas (Figura 61).¹⁶²

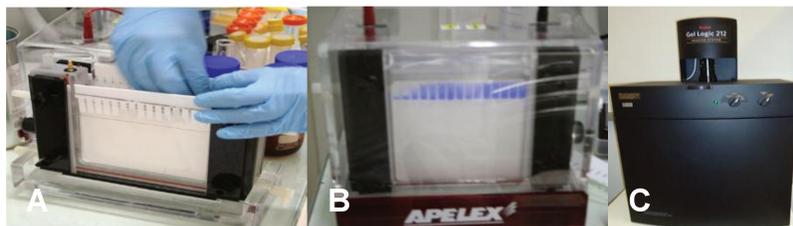


Figura 61. A- Cuba de eletroforese montada. B- Corrida em andamento. C- Sistema de foto-documentação.

9.3.11.1. Preparo do gel separador

A solução do gel separador foi preparada em um tubo tipo falcon (50 mL), misturando as soluções previamente prontas de (16,5 mL) acrilamida (30% m/v), tampão Tris-HCl (12,5 mL; 1,5 mol·L⁻¹; pH 8,8), SDS (0,5 mL; 10% m/v), persulfato de amônio (0,5 mL; 10% m/v), TEMED (0,02 mL) e água ultra-pura (16,5 mL). Depois de colocar a solução na cuba (Figura 62) adiciona-se ao gel (1 mL) de isopropanol.

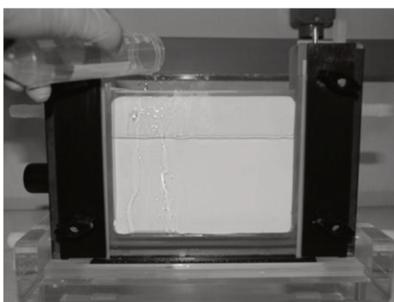


Figura 62. Transferência do gel separador para o aparato de eletroforese previamente montado

9.3.11.2. Preparo do gel concentrador

¹⁶² Sambrook, J; Russel, D.W. *Molecular Cloning: SDS-Polyacrylamide of Proteins*. 2001.

Para preparo do gel concentrador (10 mL) foi adicionado a um tubo tipo falcon, água ultra-pura (6,8 mL), solução de acrilamida (1,7 mL; 30% m/v), tampão Tris-HCl (1,25 mL; $1,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6,8), SDS (100 μL de solução a 10% m/v) e persulfato de amônio (100 μL , a 10% m/v).

9.3.11.3. Adição do gel concentrador ao sistema

Antes de adicionar o TEMED, o gel separador estava sólido e o isopropanol já removido do sistema. Em seguida, o pente foi colocado e adicionado o TEMED (10 μL) à solução do gel concentrador (Figura 63).

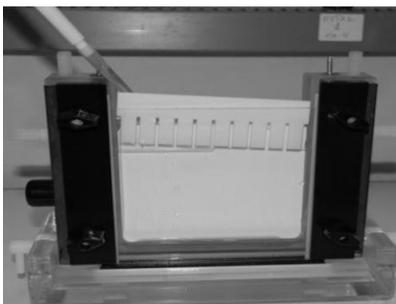


Figura 63. Adição do gel concentrador ao sistema contendo o gel separador

9.3.11.4. Adição das amostras no gel

Para a adição das frações a serem purificadas no gel, a cuba foi preenchida com tampão de Tris-Glicina (pH 8,6) e o pente retirado cuidadosamente. Com auxílio de uma pipeta volumétrica, foi adicionado aproximadamente 100 μL de amostra em cada poço. No primeiro poço, foi adicionado cerca de 20 μL de padrão de massa molecular.

9.3.12. Preparo das amostras para análises de espectrometria de massas

Cada banda do gel a ser analisada foi excisada, separadamente, e transferidas para um tubo do tipo *Eppendorf*.

9.3.12.1. Descoloração do gel

Foi adicionada ao tubo do tipo eppendorf, contendo as bandas, solução descolorante (200 μL , $25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). A cada 10 minutos esta solução foi trocada (3 vezes). Após a descoloração os fragmentos de gel foram desidratados com acetonitrila e secos em speed-vácuo.

9.3.12.2. Redução e alquilação

Os fragmentos do gel foram reidratados com 100 μL de solução de DTT ($65\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) à 56°C por 30 minutos. A solução de DTT foi retirada e em seguida, adicionada ao gel uma solução iodoacetamida (100 μL , $200\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), durante 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Posteriormente a solução de iodoacetamida foi retirada e os géis lavados com solução de bicarbonato de amônio (200 μL , pH 8,0) por 10 minutos. Em seguida, o gel foi desidratado com acetonitrila (200 μL) durante 5 minutos.

9.3.12.3. Tripsinização

A tripsina (*Promega V511*) foi preparada a partir de uma solução estoque ($200\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, estocada a -70°C) dissolvendo-a em ácido acético (100 μL , $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Foram adicionadas as amostras do gel, solução de tripsina (15 μL , $33\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), dissolvida em bicarbonato de amônio ($50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), e estocada em banho de gelo por 1 hora. Após este período, as amostras foram incubadas a 56°C por 30 minutos.

9.3.12.4. Extração dos peptídeos

A extração dos peptídeos gerados pela digestão por tripsina foi feita através da adição de solução de ácido fórmico (30 μL , 5% dissolvido em 50% de acetonitrila). As amostras foram homogeneizadas por 20 segundos em vórtex, ultrassonificadas em banho de ultrassom por 10 minutos e novamente homogeneizadas por 20 segundos. A solução resultante foi retirada e transferida para um novo tubo, sendo este procedimento repetido no tubo anterior contendo os pedaços de gel.

A solução de pós-extração (60 μL) foi concentrada por speed vácuo até o volume de aproximadamente 10 μL para retirar o excesso de acetonitrila, sendo as amostras estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes de serem injetados no Espectrômetro de massas LTQ- Orbitrap os 10 μl resultantes do preparo das amostras foram diluídos com 30 μl de ácido fórmico a 0,1%. Os resultados foram analisados no programa de identificação *Sequest* através do *Proteomic discover* utilizando o banco de dados do NCBI¹⁶³ e SwissProt¹⁶⁴ para busca.

9.3.12.5. Solução descolorante (100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Para preparação da solução descolorante (200 mL), foi adicionado bicarbonato de amônio (0,395 g) em água (50 mL).

9.3.12.6. Solução de DTT

O DTT (100 mg), juntamente com bicarbonato de amônio (0,079 mg) foram solubilizados em água ultra-pura (10 mL).

¹⁶³ Site Nacional de Biotecnologia <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

¹⁶⁴ Instituto Suíço de Bioinformática <http://web.expasy.org/groups/swissprot/>

9.3.12.7. Solução de iodoacetamida

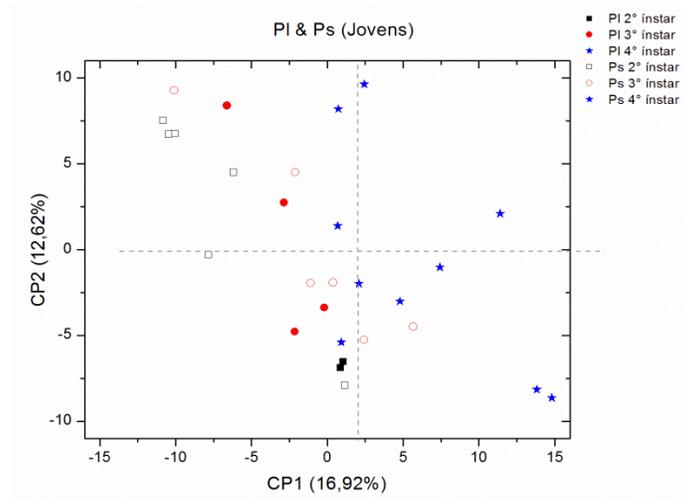
O iodoacetamida (370 mg), juntamente com bicarbonato de amônio (0,079 mg) foram solubilizados em água ultra-pura (10 mL).

ANEXOS

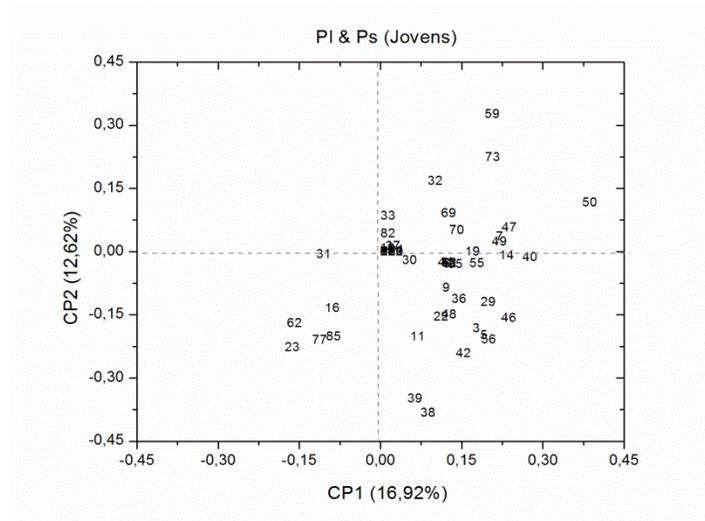
Anexo 1. Resumo dos modelos PLS-DA

n	Amostras	CPs	%Variância	R _{val}	R _{cal}	n _{amost} GP1	n _{Erro} GP1	n _{amost} GP2	n _{Erro} GP2	n _{amost} GP3	n _{Erro} GP3	n _{variáveis}
4	PL&PS: Jovens (2°, 3° e 4° instar)	3	37,84	0,5730	0,8968	9	4	10	3	9	5	100
5	PL: Jovens x Adultos	5	71,46	0,9611	0,9988	10	0	10	0	-	-	88
6	PL: Machos x Fêmeas	2	59,44	0,6574	0,9370	4	1	6	1	-	-	88
7	PL: Jovens (2°, 3° e 4° instar)	4	85,4	0,9611	0,9977	2	0	4	0	4	0	88
8	PS: Jovens x Adultos	4	58,67	0,9539	0,9939	20	0	12	0	-	-	56
9	PS: Machos x Fêmeas	6	81,25	0,8879	0,9998	6	0	6	0	-	-	56
10	PS: Jovens (2°, 3° e 4° instar)	1	37,12	0,6443	0,7724	7	2	6	1	5	3	56

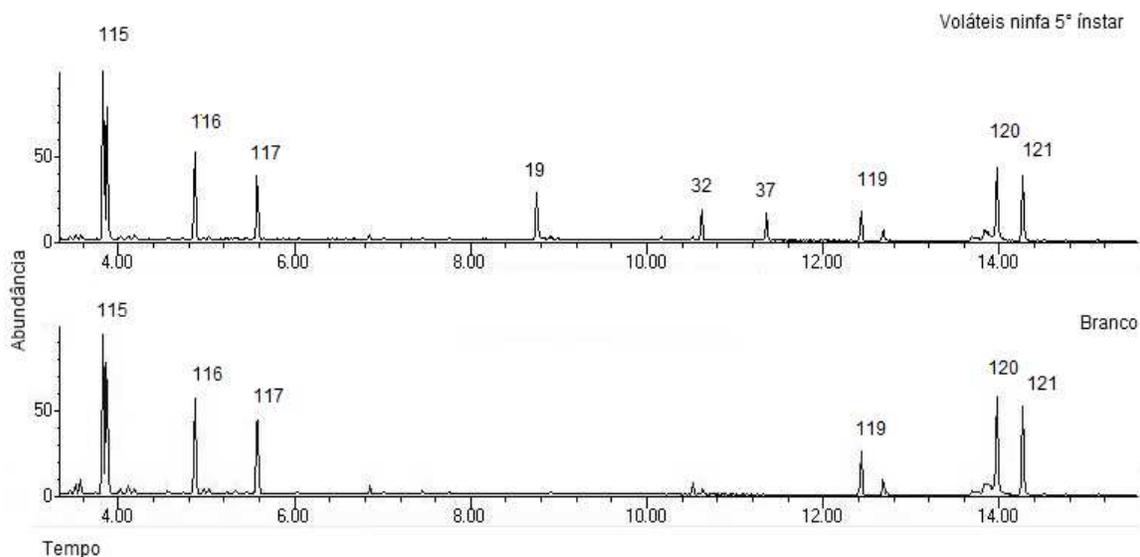
CPs, número de componentes principais; %Variância, quantidade de variância explicada pelo modelo; R_{val}, coeficiente de correlação para validação; R_{cal}, coeficiente de correlação para calibração; n_{amost} GP, número de amostras no grupo; n_{Erro}, número de erros observados pelo processo de validação cruzada (*“leave-one-out cross-validation”*) para o grupo; n_{variáveis}, número de variáveis incluídas no modelo.



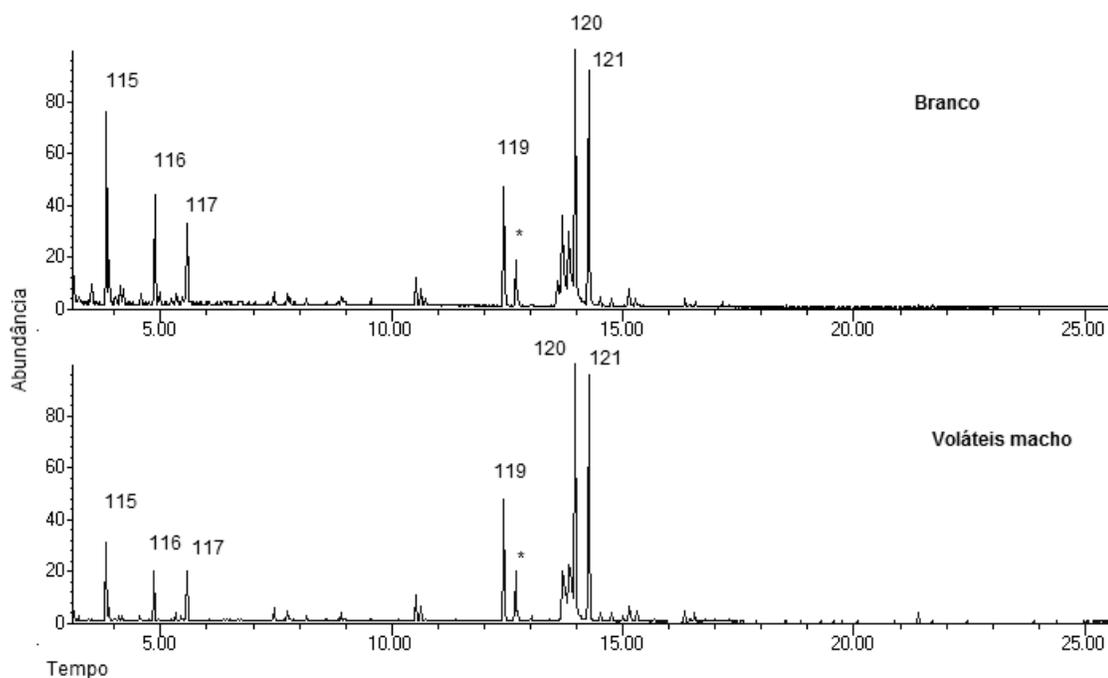
Anexo 2. Gráfico de escores para o modelo de PLS-DA (3 CP; 37,84% da variância; $R_{val} = 0,57$; $R_{cal} = 0,89$), mostrando a discriminação entre indivíduos jovens pertencentes às espécies *Phloea subquadrata* (PS) e *Phloeophana longirostris* (PL) ao longo de CP1 e PC2.



Anexo 3. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA do Anexo 2, destacando os compostos relevantes na distinção dos indivíduos jovens pertencentes às espécies *Phloeophana longirostris* (PI) e *Phloea subquadrata* (Ps).

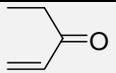
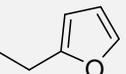
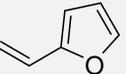
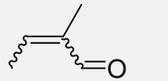
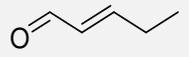
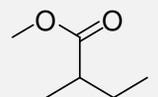


Anexo 4. Cromatograma de íons totais (CG-EM) referente à análise dos voláteis da ninfa de 5º instar *Phloea subquadrata* utilizando PorapaK-Q®. Condições de análise: 40 °C (3 min), seguida de 10 °C·min⁻¹ até 290 °C. Numeração dos picos no cromatograma (de 115 a 121, conforme Figura 7) e (19, 32 e 37, conforme Anexo 6).



Anexo 5. Cromatograma de íons totais (CG-EM) referente à análise dos voláteis do macho de *Phloea subquadrata* utilizando PorapaK-Q®. Condições de análise: 40 °C (3 min), seguida de 10 °C·min⁻¹ até 290 °C. Numeração dos picos no cromatograma (de 115 a 121, conforme Figura 7).

Anexo 6. Compostos voláteis da espécie *Phloea subquadrata* e *Phloeophana longirostris* analisados por CG-EM adsorvidos (SPME-Carboxen PDMS).

Nº	Caracterização	Peso molecular	Estrutura/Nome	TR	IR ^{cal}	IR ^{lite}	Espécie	Principais fragmentos (m/z (abundância))
1	EM	84	 1-penten-3-ona	3,38	686	689 ¹	PS	84(M ⁺ ,19), 83(5), 57(8), 55(100)
2	EM	96	 2-etilfurano	3,61	703	703 ²	PS	96(M ⁺ , 36), 81(100), 53(25), 41(9)
3	EM	94	 2-vinilfurano	4,01	723	761 ³	PS e PL	94(M ⁺ , 100), 66(31), 65(32), 63(13), 44(13)
4	EM	84	 2-metil-2-butenal	4,37	742	-	PS	84(M ⁺ , 100), 55(67), 53(18), 41(20)
5	EM	84	 (E)-2-pentenal	4,60	754	757 ⁴	PS e PL	84(M ⁺ , 60), 83(76), 55(100), 53(19), 41(41)
6	EM	ND	 2-ethyl-2-methylbutanoate	5,07	778	777 ⁵	PS e PL	101(28), 88(100), 85(29), 59(20), 57(76), 41(37)

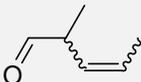
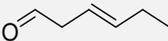
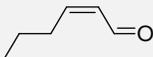
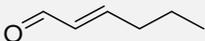
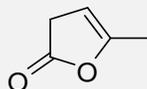
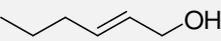
¹ Jordan, M.J.; *et. al.* *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 5386-5390.

² García, C.; Martín, A.; Timón, M.L.; Córdoba, J.J. *Lett. Appl. Microbiol.* **2000**, 30, 61-66.

³ Beal, A. D.; Mottram, D.S. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 12, 2880-2884.

⁴ Methven L.; *et. al.* Mottram D.S. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 1427-1436.

⁵ Rychlik, M.; Bosset, J.O. *Int. Dairy J.* **2001**, 11, 895-901.

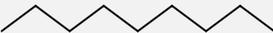
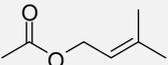
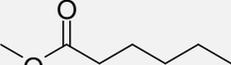
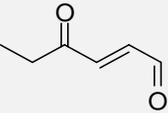
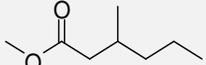
7	EM	98	<p>2-metilbutanoato de metila</p>  <p>2-metil-3-pentenal</p>	5,50	800	-	PS e PL	98(M ⁺ , 9), 69(44), 57(28), 56(42), 55(34), 44(36), 43(32), 42(22), 41(100)
8	EM	ND	 <p>(E)-3-hexenal</p>	5,50	800	803 ⁶	PS	82(18), 72(18), 69(26), 57(49), 56(72), 55(31), 44(70), 43(47), 41(100)
9	EM	98	 <p>(Z)-2-hexenal</p>	6,57	850	841 ⁷	PS e PL	98(M ⁺ , 11), 83(100), 70(23), 69(67), 57(21), 56(22), 55(81), 43(20), 42(35), 41(75)
10	RMN e PS	98	 <p>(E)-2-hexenal</p>	7,18	878	853 ⁸	PS e PL	98(M ⁺ , 28), 83(81), 69(88), 57(49), 55(93), 42(57), 41(100)
11	EM	98	 <p>5-metil-2(3H)-furanona</p>	7,20	879	901 ⁹	PS e PL	98(M ⁺ , 100), 55(91), 43(54), 42(12)
12	EM e PS	100	 <p>(E)-2-hexen-1-ol</p>	7,21	880	862	PS e PL	100(M ⁺ , 2), 81(25), 67(20), 57(100), 41(38)
13	-	ND	desconhecido	7,35	886		PS	112(56), 97(100), 95(26), 94(31), 84(17), 69(28), 43(21), 41(29)

⁶ Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. **2001**.

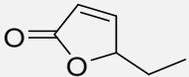
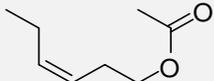
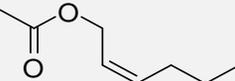
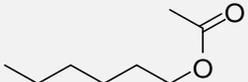
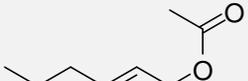
⁷ Ruther, J. *J. Chromatogr. A*.**2000**, 890, 313-319.

⁸ Medina, A.L.; *et. al. J. Agric. Food Chem.***2005**, 53, 8694-8698.

⁹ Georgilopoulos, D.N.; Gallois, A.N. *Food Chem.***1988**, 28, 141-148.

14	EM e PS	128	 nonano	7,64	900	900	PS e PL	128(M ⁺ , 16), 85(37), 71(30), 70(33), 57(88), 56(27), 55(30), 43(100), 42(27), 41(40)
15	EM	96	 2,4-hexadienal	7,88	912	909	PS e PL	96(M ⁺ , 40), 81(100), 67(30), 53(26), 41(26)
16	EM	ND	 Acetato de 3-metil-2-butenila	7,95	916	925 ¹⁰	PS e PL	86(43), 71(37), 69(33), 68(71), 53(31), 43(100), 41(34)
17	EM	ND	 hexanoato de metila	8,17	927	934	PS e PL	99(27), 87(33), 74(100), 59(20), 43(30)
18	EM	112	 3-hepten-2-ona	8,82	936	-	PS	112(M ⁺ , 28), 97(80), 55(100), 43(49), 41(28)
19	PS e RMN	112	 (E)-4-oxo-2-hexenal	8,76	957	-	PS e PL	112(M ⁺ , 17), 84(15), 83(100), 57(13), 55(49)
20	EM	ND	 3-metilexanoato de metila	8,94	967	-	PS e PL	113(10), 101(24), 88(100), 57(34), 55(26), 44(15), 43(27), 41(25)

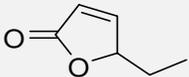
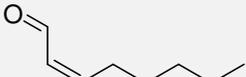
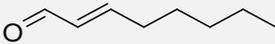
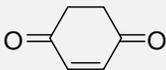
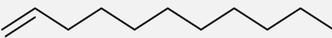
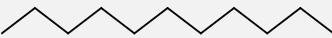
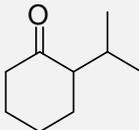
¹⁰ Guichard, E.; Souty, M.Z. *Lebensm. Unters. Forsch.* **1988**, 186, 301-307.

22	EM	112	 5-etil-2(3H)-furanona	9,12	976	978 ¹¹	PS e PL	112(M ⁺ , 16), 84(15), 83(100), 57(13), 55(52)
23	-	112	desconhecido	9,06	973	-	PS e PL	112(M ⁺ , 67), 97(14), 83(30), 55(100)
24	EM	142	 decano	9,59	1000	1000	PS e PL	142(M ⁺ , 10), 85(35), 71(45), 57(100), 43(81), 41(38)
25	EM	ND	 acetato de (Z)-3-hexenila	9,71	1007	-	PS e PL	82(66), 67(100), 54(11), 43(99), 41(17)
26	EM	ND	 acetato de (Z)-2-hexenila	9,72	1008	1005 ¹²	PS	100(24), 82(37), 67(57), 55(27), 43(100), 41(21)
27	EM	ND	 acetato de hexila	9,81	1012	1008	PS e PL	84(25), 69(20), 61(27), 56(52), 55(28), 43(100), 41(21)
28	EM, RMN	142	 acetato de (E)-2-hexenila	9,85	1015	1014 ¹³	PS e PL	142(M ⁺ , 1), 100(26), 82(40), 67(53), 55(20), 43(100), 41(22)
29	-	110	desconhecido	10,08	1028	-	PS e PL	110(M ⁺ , 100), 82(100), 81(23), 68(39), 55(28), 54(94), 53(26)

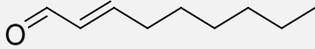
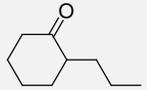
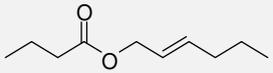
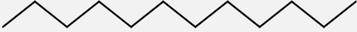
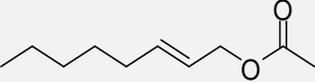
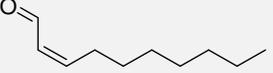
¹¹ Takeoka, G.; Perrino, C., Jr.; Buttery, R. *J. Agri. Food Chem.* **1996**, 44, 654-660.

¹² Tret'yakov, K.V. Retention Data. *NIST Mass Spectrometry Data Center*. **2008**.

¹³ Gómez, E.; Ledbetter, C.A.; Hartsell, P.L. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, 41, 10, 1669-1676.

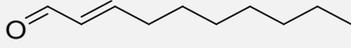
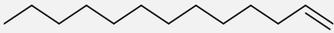
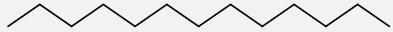
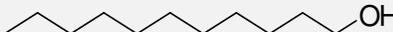
30	EM	112	 5-etil-2(5H)-furanona	10,29	1040	-	PS e PL	112(M ⁺ , 1), 84(15), 83(100), 55(25)
31	EM	ND	 (Z)-2-octenal	10,42	1047	1048	PS e PL	84(20), 83(100), 82(31), 70(52), 69(19), 57(19), 55(56), 41(34)
32	EM e RMN	126	 (E)-2-octenal	10,65	1060	1060	PS e PL	84(20), 82(40), 70(100), 69(49), 67(25), 57(57), 55(92), 41(88)
33	-	ND	desconhecido	10,83	1070	-	PS e PL	96(55), 81(81), 67(16), 55(31), 43(100), 41(19)
35	EM	110	 2-cicloexene-1,4-diona	11,02	1082	-	PS	110(M ⁺ , 100), 82(92), 81(17), 68(37), 55(18), 54(95), 53(25)
36	-	154	 (E)-1-undeceno	11,21	1092	1090 ¹⁴	PS e PL	154(M ⁺ , 8), 97(45), 84(46), 83(69), 71(27), 70(91), 69(81), 57(58), 56(87), 55(100), 43(94), 41(95)
37	EM, RMN	156	 undecano	11,35	1100	1100	PS e PL	156(M ⁺ , 10), 85(41), 84(12), 85(41), 71(60), 57(100), 56(20), 43(73), 41(44)
38	-	ND	 2-isopropilcicloexanona	12,03	1143	-	PS e PL	125(17), 111(100), 98(91), 97(22), 84(30), 83(77), 70(43), 57(37), 55(94), 41(44)

¹⁴ Ohnishi, S.; Shibamoto, T.J. *Agric. Food Chem.* **1984**, 32, 987-992

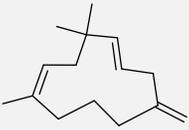
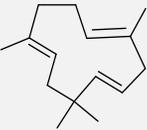
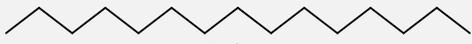
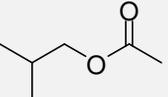
39	-	ND	 (E)-2-nonenal	12,31	1160	1162 ¹⁵	PS e PL	111(46), 98(49), 97(25), 84(31), 83(76), 70(59), 69(32), 57(54), 56(24), 55(100), 43(59), 41(65) 140(M ⁺ , 12), 112(13), 111(20), 98(100), 97(27), 83(20), 70(35), 57(16), 56(16), 55(69), 41(19) 170(2), 82(19), 71(100), 67(28), 55(24), 43(37), 41(24)
40	EM	140	 2-propilciclohexanona	12,39	1165	-	PS e PL	170(M ⁺ , 10), 85(37), 71(65), 70(14), 57(100), 56(16), 55(18), 43(82), 41(40) 128(15), 110(18), 95(11), 82(19), 81(30), 67(26), 55(22), 54(40), 43(100), 41(28)
41	EM	170	 butanoato de 2-hexenila	12,83	1193	-	PS e PL	111(20), 110(26), 97(16), 84(30), 83(100), 81(20), 70(84), 69(30), 57(31), 55(67), 43(42), 41(54)
42	EM e PS	170	 dodecano	12,94	1200	1200	PS e PL	152(M ⁺ , 5), 111(18), 110(18), 109(21), 96(19), 95(56), 81(100), 79(43), 70(26), 67(55), 55(69), 41(71)
43	EM	ND	 acetato de (E)-2-octenila	13,09	1210	-	PS e PL	
44	EM	ND	 (Z)-2-decenal	13,69	1251	1252 ¹⁶	PS	
45	EM	152	 2,4-decadienal	13,75	1255	-	PS	

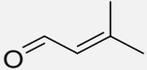
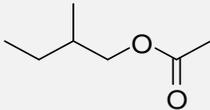
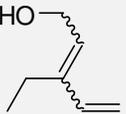
¹⁵ Valim, M.F.; Rouseff, R.L.; Lin, J. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 1010-1015.

¹⁶ Campeol, E.; *et. al. J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 1994-1999.

46	EM	ND	 (E)-2-decenal	13,88	1264	1264	PS e PL	110(19), 98(28), 97(26), 83(68), 81(30), 79(16), 70(100), 69(47), 68(25), 57(56), 56(35), 55(86), 43(78), 42(19), 41(84) 182(M ⁺ , 42), 111(21), 97(45), 84(32), 83(62), 70(63), 69(100), 57(38), 56(61), 55(91), 43(40), 41(66)
47	EM	182	 (E)-1-trideceno	14,23	1288	1288 ¹⁷	PS	182(M ⁺ , 41), 97(42), 83(61), 70(58), 69(79), 57(45), 56(59), 55(100), 43(64), 41(64)
48	EM	182	trideceno isômero 2	14,26	1290	-	PS e PL	182(M ⁺ , 9), 111(31), 98(25), 97(67), 84(44), 83(81), 70(71), 69(88), 57(74), 56(74), 55(100), 43(84), 41(89)
49	EM	182	trideceno isômero 3	14,30	1293	-	PS e PL	184(M ⁺ , 12), 85(52), 71(73), 57(100), 55(20), 43(67), 41(39)
50	EM, PS	184	 tridecano	14,41	1300	1300	PS e PL	198(M ⁺ , 8), 85(51), 71(69), 57(100), 43(71), 41(30)
51	EM	198	 tetradecano	15,79	1400	1400	PS e PL	126(27), 111(33), 98(29), 97(69), 84(62), 83(79), 82(48), 70(81), 69(100),
52	EM	ND	 undecanol	16,22	1433	-	PS	

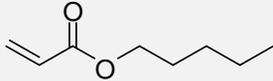
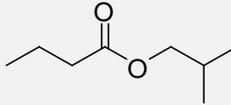
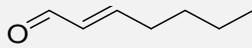
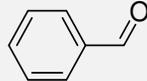
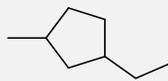
¹⁷ Beens, J.; Tijssen, R.; Blomberg, J. *J. Chromatogr. A.* **1998**, 822, 233-251.

53	EM	204	 <p>β-humuleno</p>	16,31	1439	1441	PS e PL	68(34), 57(54), 56(83), 55(98), 43(74), 42(29), 41(71) 204(M ⁺ , 10), 161(41), 147(35), 133(100), 121(31), 120(45), 119(47), 107(49), 105(62), 93(100), 91(83), 81(39), 79(70), 77(41), 69(71), 67(34), 41(67)
54	EM	204	 <p>α-cariofileno</p>	16,76	1474	1454	PS e PL	204(M ⁺ , 10), 147(24), 121(33), 93(100), 91(19), 80(32), 79(16), 67(11)
55	EM	210	isômero do pentadeceno	16,89	1484	-	PS	210(M ⁺ , 28), 111(27), 97(42), 84(31), 83(80), 82(24), 70(49), 69(59), 57(53), 56(40), 55(100), 54(24), 44(21), 43(56), 41(44)
56	EM	ND	 <p>pentadecano</p>	17,10	1500	1500 ⁶	PS e PL	85(47), 71(67), 70(18), 57(100), 56(16), 55(25), 43(63), 41(34)
57	EM	ND	 <p>acetato de 2-metilpropanoato</p>	4,86	767	-	PL	86(4), 73(28), 56(41), 43(100), 41(16), 32(11), 28(34)

58	EM	84	 3-metil-2-butenal	5,10	780	758 ¹⁸	PL	84(M ⁺ , 100), 83(45), 55(58), 53(15), 41(29), 39(29), 32(30), 28(83)
59	EM	98	isômero furanona	6,94	867	-	PL	98(M ⁺ , 97), 55(100), 43(65), 42(16)
60	EM	ND	isômero hexenol	7,00	870	-	PL	82(24), 71(11), 67(20), 57(100), 44(15), 43(16), 41(40)
61	EM	ND	 acetato de 2-metilbutenila	7,08	874	877 ¹⁹	PL	101(2), 98(1), 73(24), 70(660), 57(18), 55(27), 43(100), 41(17), 29(10)
62	-	ND	desconhecido	7,34	886	-	PL	112(47), 97(100), 95(30), 69(28), 55(19), 44(10), 41(45)
63	EM	ND	 3-etil-2,4-pentadien-1-ol	8,01	919	-	PL	98(6), 97(40), 83(96), 69(24), 55(100), 53(25), 41(64)
64	EM	112	 2-etil-2-pentenal	8,29	933	-	PL	112(M ⁺ , 29), 97(55), 83(36), 71(23), 69(32), 55(100), 43(44), 42(29), 41(73)

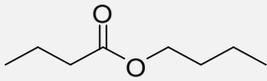
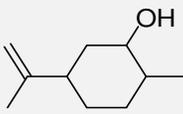
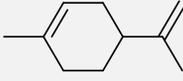
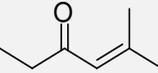
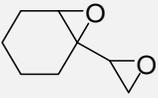
¹⁸ Engel, E.; *et. al. J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 6459-6467.

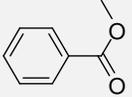
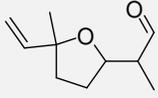
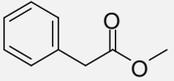
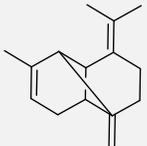
¹⁹ Flamini, G.; *et. al. Food Chem.* **2004**, 85, 599-604.

65	EM	ND	 2-propenoato de pentila	8,52	945	-	PL	83(12), 73(86), 70(73), 55(95), 45(100), 43(76), 42(49), 41(52)
66	EM	ND	 butanoato de 2-metilpropila	8,57	948	-	PL	116(2),89(13), 71(100), 57(28), 56(34), 43(34), 41(22),28(14)
67	EM	ND	 (E)-2-heptenal	8,80	960	960 ²⁰	PL	83(93), 70(42), 69(46), 68(38), 57(61), 56(49), 55(73), 43(36), 42(26), 41(100)
68	EM	106	 benzaldeído	8,85	962	961	PL	106(M ⁺ , 100), 77(85), 51(34),50(20)
69	EM	112	isômero do furano	9,02	971	-	PL	112(M ⁺ , 16), 84(16), 83(100), 57(13), 55(57)
70	EM	112	 3-metil-1-etilciclopentano	9,49	995	-	PL	112(M ⁺ , 4), 84(36), 83(51), 55(100), 53(11), 43(15), 41(44)
71	EM	136	 3-metil-1-etilciclopentano	9,44	992	990 ²¹	PL	136(M ⁺ , 5), 93(100), 91(24), 79(17), 69(69), 41(77)

²⁰ Methven L.; *et. al.* *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 1427-1436.

²¹ Hognadottir, A.; Rouseff, R.L. *J. Chromatogr. A.* **2003**, 998, 201-211.

72	EM	ND	<p>β-pineno</p>  <p>butanoato de butila</p>	9,50	995	995	PL	105(6), 89(67), 71(100), 57(21), 56(49), 55(42), 43(53), 41(58)
73	EM	ND	desconhecido	9,51	996	-	PL	84(30), 55(100), 41(37)
74	EM	ND	isômero do decano	9,84	1014	-	PL	113(20), 71(92), 70(39), 67(22), 57(83), 55(28), 43(100), 41(38), 28(27)
75	EM	ND	 <p>2-metil-5-(2-metil-2-propenila)-cicloexanol</p>	9,99	1023	-	PL	93(72), 79(37), 68(91), 67(100), 57(58), 55(48), 53(31), 43(80), 41(50), 28(74)
76	EM	136	 <p>limoneno</p>	10,16	1032	10296	PL	136(M ⁺ , 29), 121(36), 107(29), 94(35), 93(75), 79(42), 68(100), 67(75), 53(23)
77	EM	112	 <p>5-metil-4-hexen-3-ona</p>	10,27	1038	-	PL	112(M ⁺ , 9), 84(15), 83(100), 55(29)
78	EM	ND	 <p>3-oxiranil-7-Oxabiciclo[4.1.0]heptano</p>	10,47	1050	-	PL	121(22), 95(55), 93(99), 91(58), 83(45), 81(77), 55(100), 41(77)
79	EM	ND	desconhecido	11,19	1091	-	PL	111(13), 97(32), 84(34),

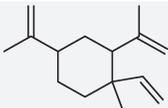
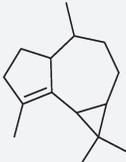
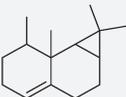
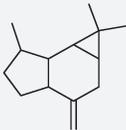
80	EM	136	 <p>éster metílico do ácido benzóico</p>	11,29	1097	1096 ²²	PL	83(71), 70(78), 69(67), 57(71), 56(58), 55(97), 41(100) 136(M ⁺ , 40), 105(100), 77(55), 51(19)
81	EM	ND	 <p>aldeído "lilalic"</p>	12,07	1145	1155 ²³	PL	156(22), 111(48), 93(56), 71(45), 69(49), 67(50), 55(100), 43(84), 41(71)
82	EM	150	 <p>fenilacetato de metila</p>	12,64	1181	1179 ²⁴	PL	150(M ⁺ , 36), 91(100), 68(11), 65(16), 57(12)
83	EM	ND	desconhecido	15,60	1386		PL	136(18), 121(21), 93(39), 69(100), 68(40), 43(57), 41(55)
84	EM	204	 <p>α- copaeno</p>	15,80	1401	1391 ²⁵	PL	204(M ⁺ , 20), 161(100), 119(94), 105(82), 93(42), 91(41), 81(19), 77(20), 41(24)
85	EM	ND	desconhecido	15,83	1403	-	PL	154(10), 83(31), 71(23), 57(100), 55(26), 41(33)

²² Mahattanatawee, K.; et. al. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* **2005**, 118, 414-418.

²³ Flamini, G.; Cioni, P.L.; Morelli, I. *Flavour Fragr. J.* **2002**, 17, 147-149.

²⁴ Efingerwell, J.C.; Alford, E.D. *J. Environ. Agric. Food Chem.* **2005**, 4, 899-915.

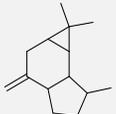
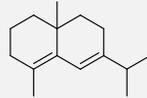
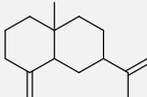
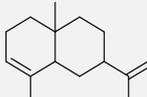
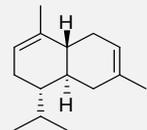
²⁵ Hognadottir, A.; Rouseff, R.L. *J. Chromatogr. A.* **2003**, 998, 201-211.

86	EM	204	 <p>β-elemeno</p>	15,85	1405	1393 ²⁶	PL	204(M ⁺ , 4), 189(39), 161(51), 147(49), 133(33), 119(43), 107(64), 93(100), 81(87), 53(40)
87	EM	204	 <p>α-gurjuneno</p>	16,16	1428	1409	PL	204(M ⁺ , 100), 161(79), 105(73), 91(57), 41(42)
88	EM	204	 <p>epi-biciclosesquifelandreno</p>	16,24	1434	1430 ²⁷	PL	204(M ⁺ , 7), 161(15), 120(11), 119(15), 105(31), 91(24), 32(32), 28(100)
89	EM	ND	 <p>β-gurjuneno</p>	16,41	1448	1432	PL	161(100), 119(22), 105(36), 93(14), 91(31), 79(15)
90	EM	204	 <p>β-aromadendreno</p>	16,60	1462	1459 ²⁸	PL	204(M ⁺ , 39), 147(38), 133(62), 119(38), 105(60), 93(100), 69(99), 67(37)

²⁶ Choi, H. J. *Agric. Food Chem.* **2003**,51, 2687-2692.

²⁷ Kucuk, M.; *et. al.Pharm. Biol.* **2006**, 44, 8, 592-599.

²⁸ Letchamo, W.; Ward, W.; Heard, B.; Heard, D.J. *Agric. Food Chem.* **2004**,52, 3915-3919.

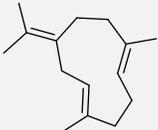
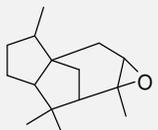
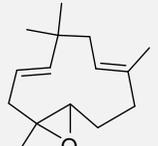
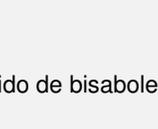
91	EM	204	 α -aromadendreno	16,85	1481	1483 ²⁹	PL	204(M ⁺ , 47), 189(33), 161(89), 147(55), 133(68), 119(58), 107(69),
92	EM	204	desconhecido	16,95	1488	-	PL	204(M ⁺ , 13), 161(26), 105(100), 91(38), 79(20)
93	EM	204	 d-selineno	16,99	1492	1493	PL	204(M ⁺ , 45), 189(100), 161(21), 147(25), 133(51), 105(32)
94	EM	204	 β -selineno	17,18	1506	1511 ³⁰	PL	204(M ⁺ , 76), 189(62), 161(98), 147(57), 133(65), 105(100), 93(93)
95	EM	204	 α -selineno	17,29	1515	1517 ³¹	PL	204(M ⁺ , 54), 189(100), 175(30), 161(35), 147(30), 81(35), 67(20)
96	EM	204	 β -cadineno	17,57	1538	1526 ³²	PL	204(M ⁺ , 61), 161(100), 134(53), 119(54), 91(32), 55(10)

²⁹ Duckham, S.C.; et. al. *Nahrung Food*.**2001**, 45, 5, 317-323.

³⁰ Chung, T.Y.; Eiserich, J.P.; Shibamoto, T. *J. Agric. Food Chem.***1993**, 41, 1693-1697.

³¹ Hognadottir, A.; Rouseff, R.L. *J. Chromatogr. A*.**2003**, 998, 201-211.

³² Limberger, R.P.; et. al. *Quim. Nova*.**2004**, 27, 6, 916-919.

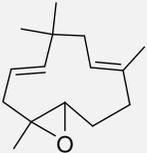
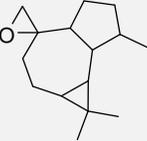
97	EM	204	 <p>β-germacreno</p>	17,86	1562	1560 ³³	PL	204(M ⁺ , 24), 189(32), 107(100), 93(55), 91(46), 79(50)
98	EM	220	 <p>epóxido de isoaromadendreno</p>	18,01	1574	1579 ³⁴	PL	220(M ⁺ , 12), 205(10), 135(61), 119(37), 107(100), 93(58), 79(69)
99	EM	220	 <p>óxido de cedreno</p>	18,18	1588	1590 ³⁵	PL	220(M ⁺ , 23), 177(100), 135(37), 119(57), 91(47), 43(55)
100	EM	138	 <p>epóxido de humuleno II</p>	18,27	1595	1606 ³⁶	PL	138(100), 109(62), 96(96), 83(18), 82(32), 55(36)
101	EM	220	 <p>óxido de bisaboleno</p>	18,59	1621	1619	PL	220(M ⁺ , 3), 138(22), 121(36), 93(100), 91(28), 80(39) 67(22), 55(21)

³³ Hognadottir, A.; Rouseff, R.L. *J. Chromatogr. A.* **2003**,998, 201-211.

³⁴ Congiu, R.; *et. al. Flavour Fragr. J.* **2002**,17, 239-244.

³⁵ Menon, A.N.; Chacko, S.; Narayanan, C.S. *Flavour Fragr. J.* **1999**, 14, 65-68.

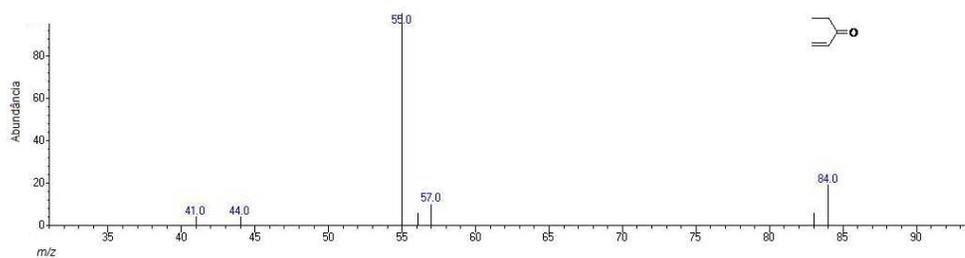
³⁶ Adams, R.P. *Biochem. Syst. Ecol.* **1998**, 26, 637-645.

102	EM	220	 óxido humuleno III	18,74	1633	1626 ³⁷	PL	220(5), 205(4), 204(1), 138(80), 123(38), 109(100), 67(79), 55(38), 43(66)
103	EM	220	 epóxido de allo-aromadendreno	18,97	1652	1646 ³⁸	PL	220(5), 205(22), 121(20), 81(100), 79(41), 67(41), 41(57)

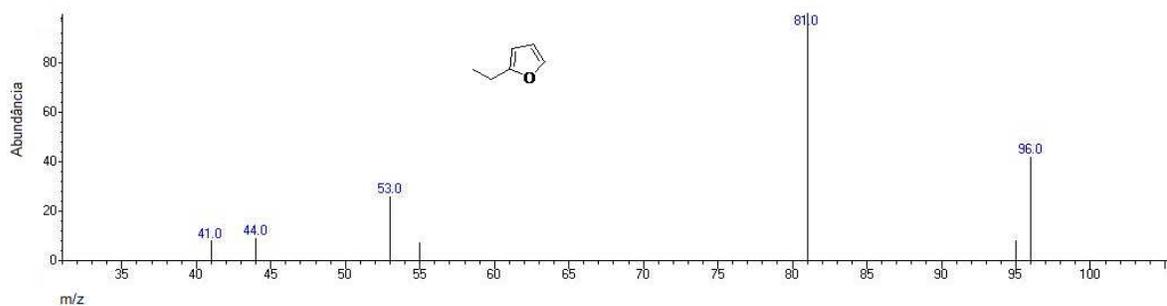
PS: padrão sintético. (-) sem informações. EM: identificação por espectrometria de massas. RMN: elucidação estrutural do produto natural por ressonância magnética nuclear. ND: íons moleculares não detectados. TR: tempo de retenção em minutos. IR^{cal}: índice de retenção calculado. IR^{litera}: índice de retenção da literatura. PL: *Phloeophana longirostris*. PS: *Phloea subquadrata*.

³⁷ <http://webbook.nist.gov/cgi/>

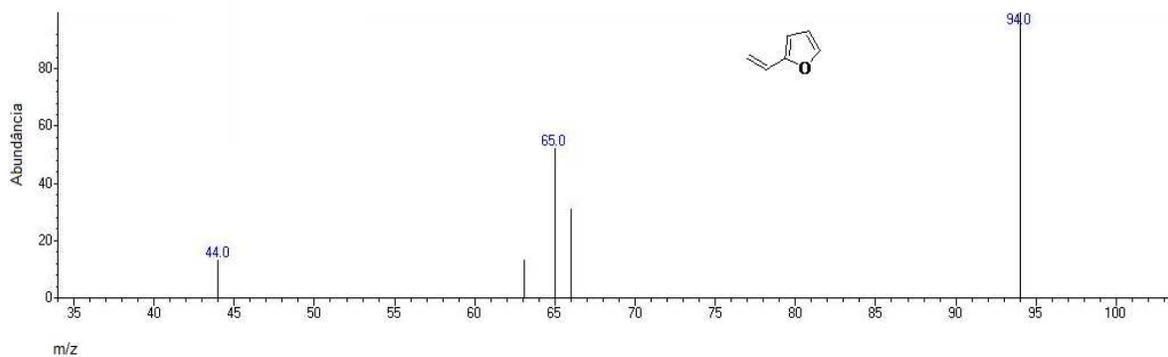
³⁸ Sylvestre, M.; et. al. *Ethnopharmacol.* **2006**, 103, 99-102.



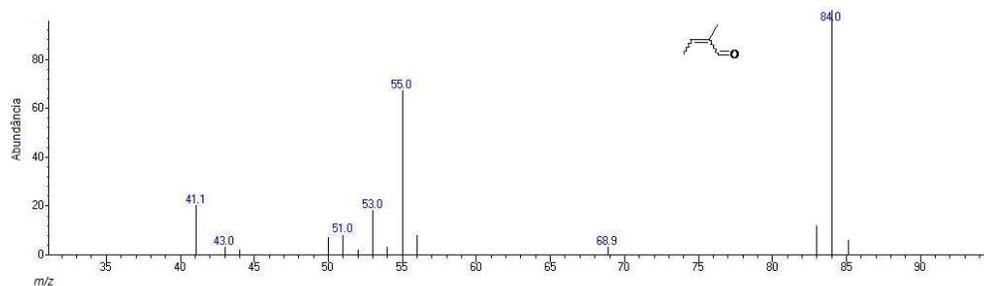
Anexo 7. Espectro de massas (CG-EM/SPME) da 1-penten-3-ona (1).



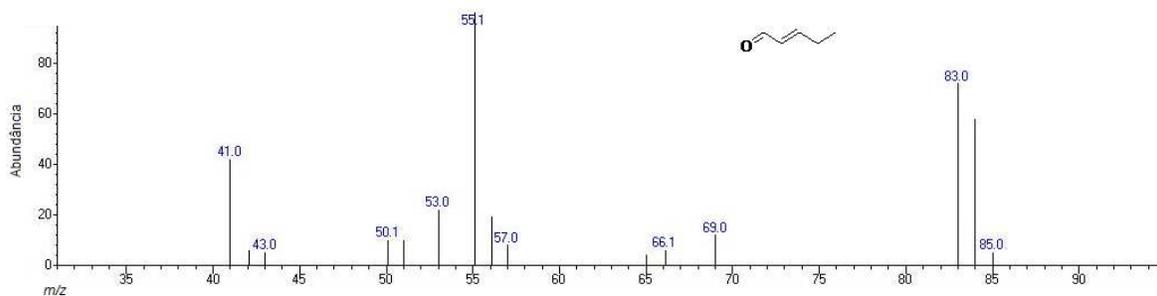
Anexo 8. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 2-etilfurano (2).



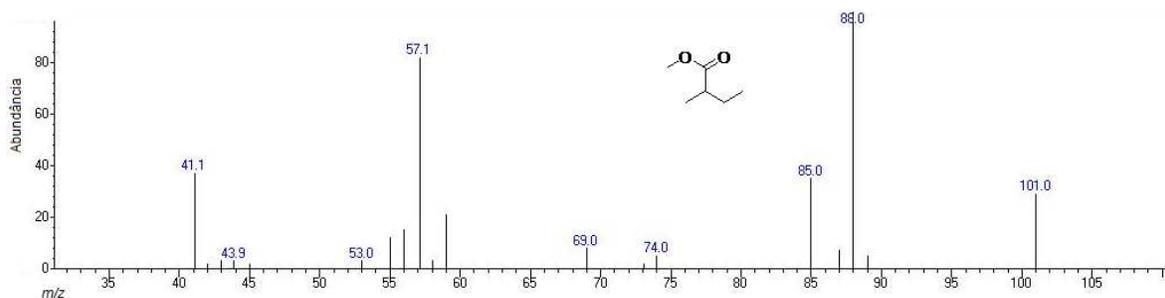
Anexo 9. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2-vinilfurano (3).



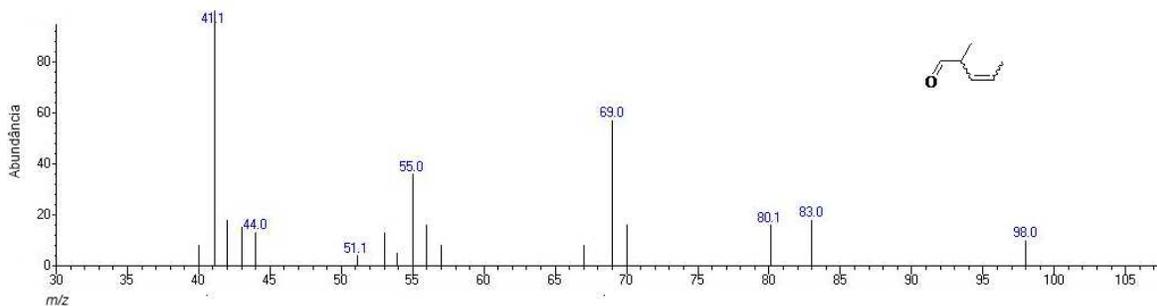
Anexo 10. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2-metil-2-butenal (4).



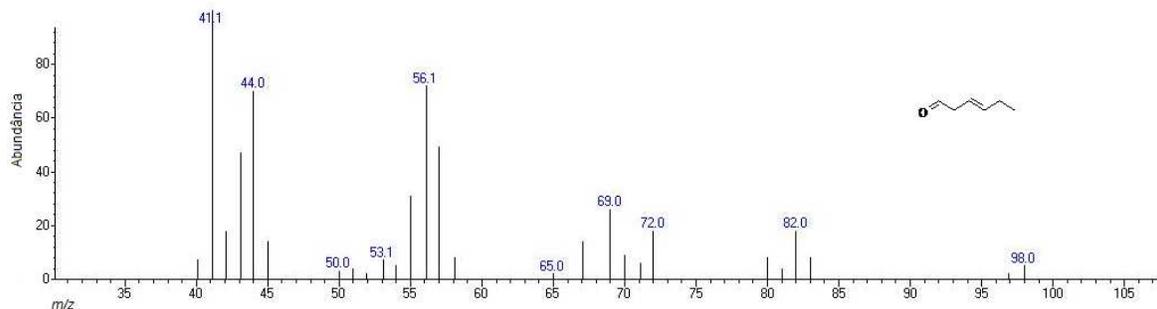
Anexo 11. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (*E*)-2-pentenal (5).



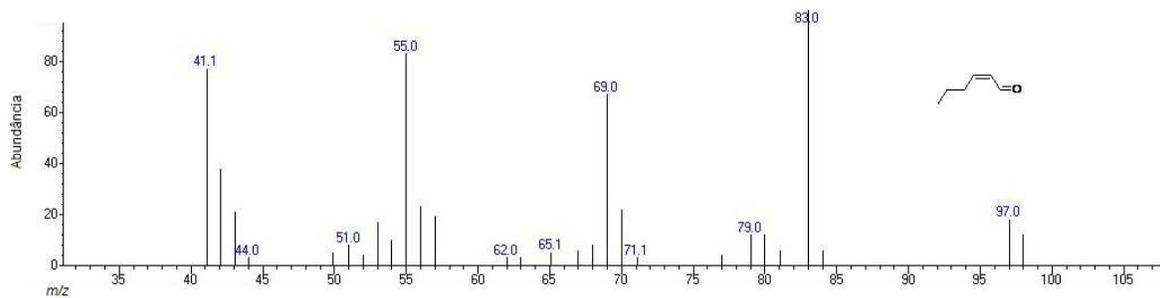
Anexo 12. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2-metil-butanoato de metila(6).



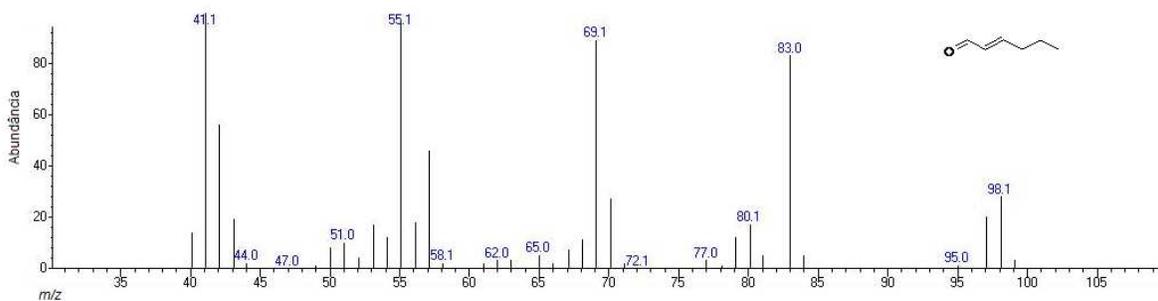
Anexo 13. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 2-metil-3-pentenal (7).



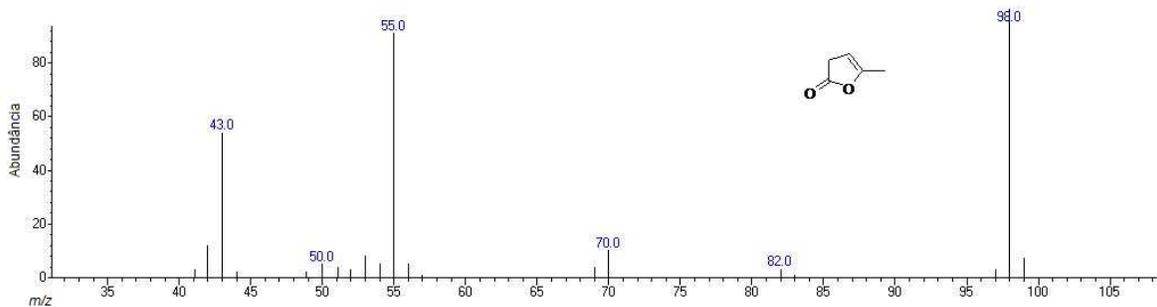
Anexo 14. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto (*E*)-3-hexenal (8).



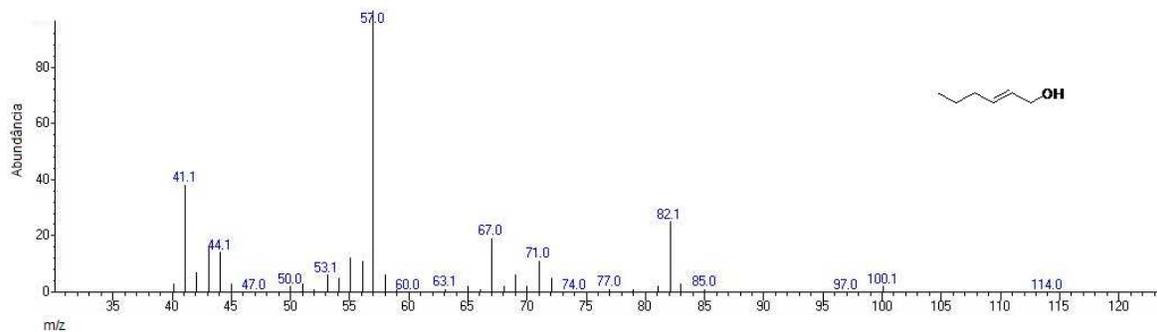
Anexo 15. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto (*Z*)-2-hexenal (**9**).



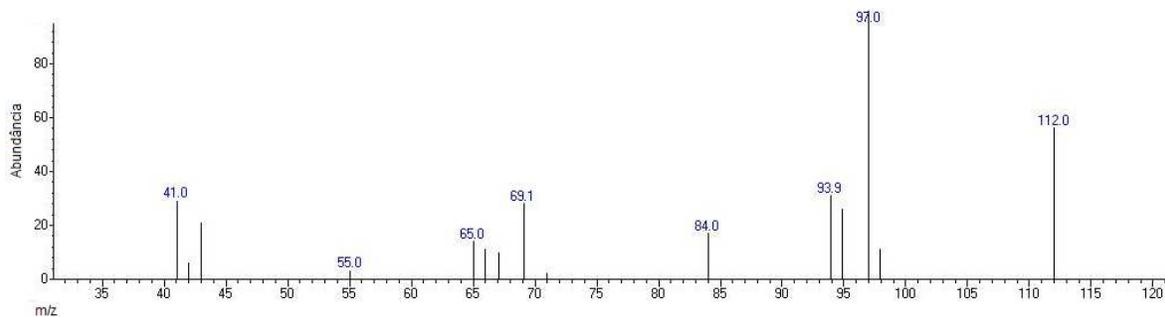
Anexo 16. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (*E*)-2-hexenal (**10**).



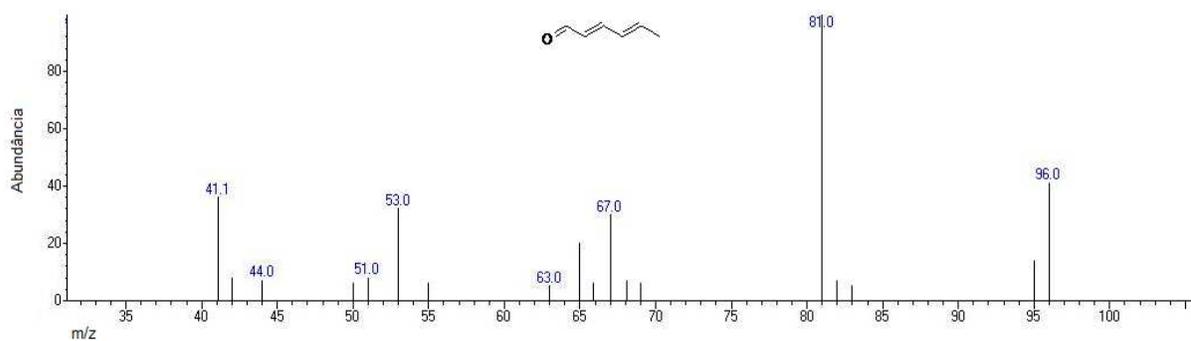
Anexo 17. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 5-metil-2(3H)-furanona (**11**).



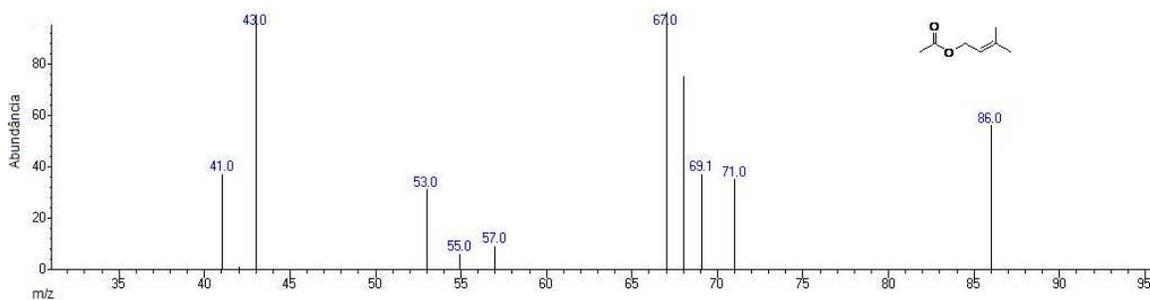
Anexo 18. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (*E*)-2-hexen-1-ol (**12**).



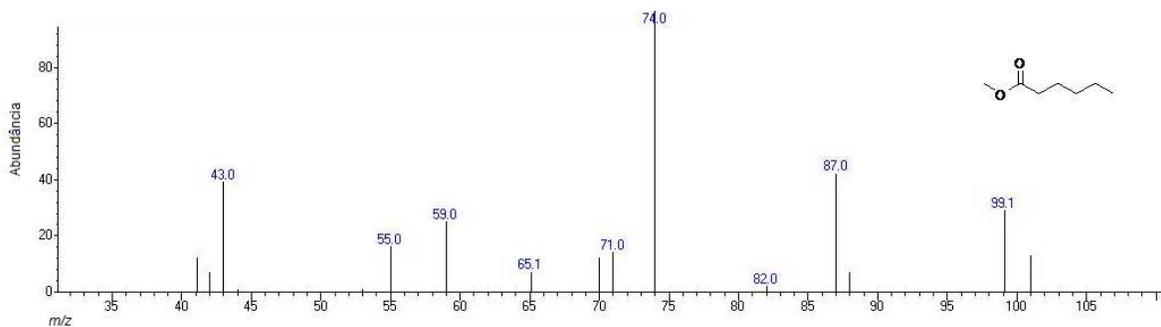
Anexo 19. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto **13**.



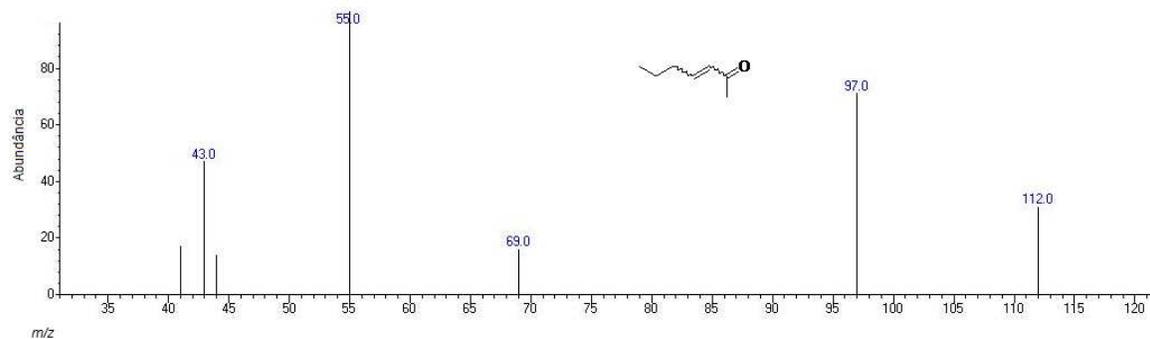
Anexo 20. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2,4-hexadienal (**15**).



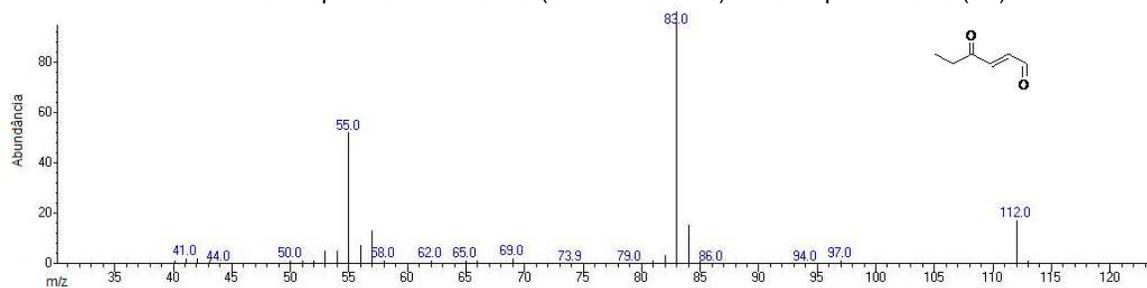
Anexo 21. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do acetato-3-metil-2-butenila (**16**).



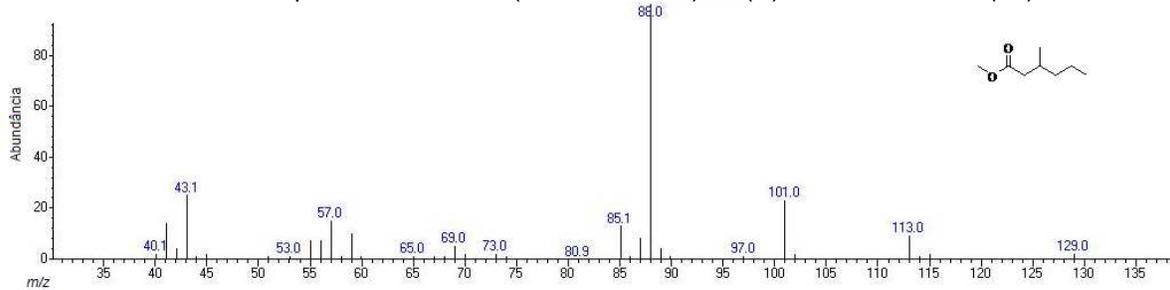
Anexo 22. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do hexanoato de metila (**17**).



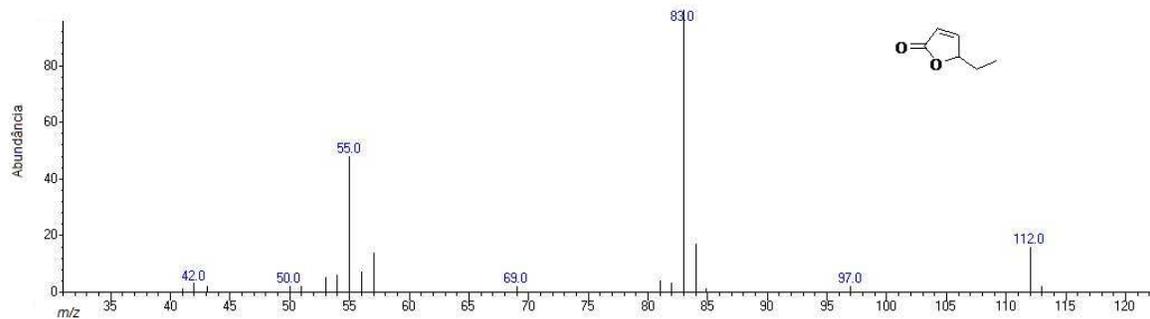
Anexo 23. Espectro de massas (CG-EM/SPME) da 3-hepten-2-ona (18).



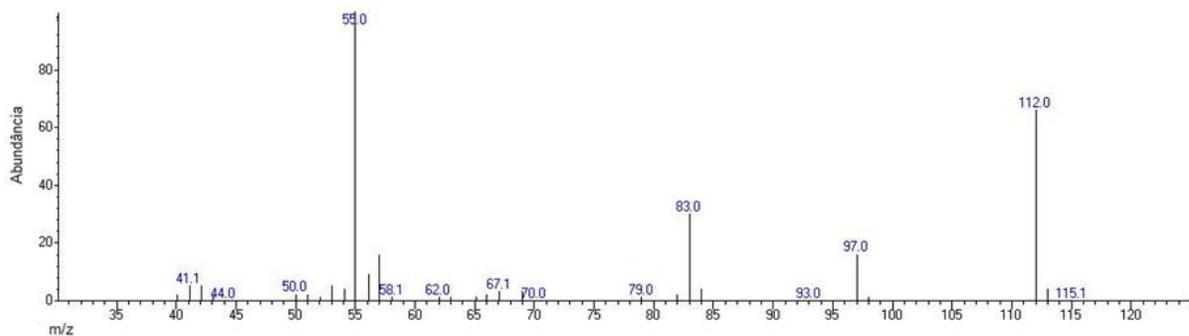
Anexo 24. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (E)-4-oxo-2-hexenal (19).



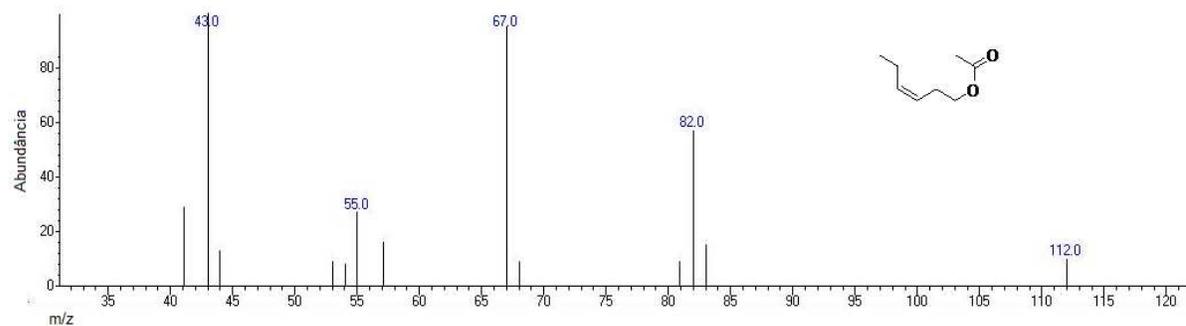
Anexo 25. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 3-metilexanoato de metila (20).



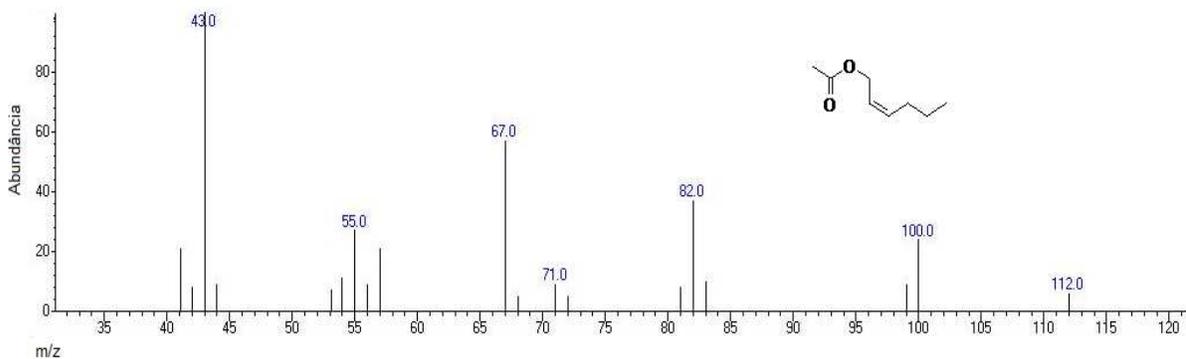
Anexo 26. Espectro de massas (CG-EM/SPME) da 5-etil-2(3H)-furanona (22).



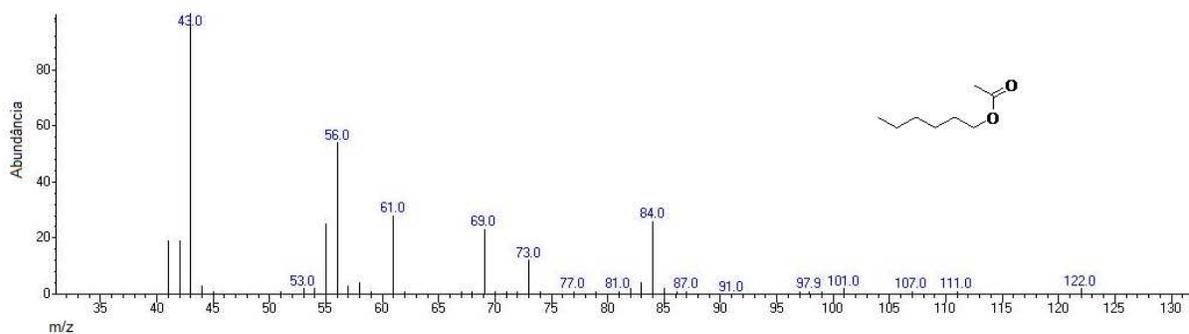
Anexo 27. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto **23**.



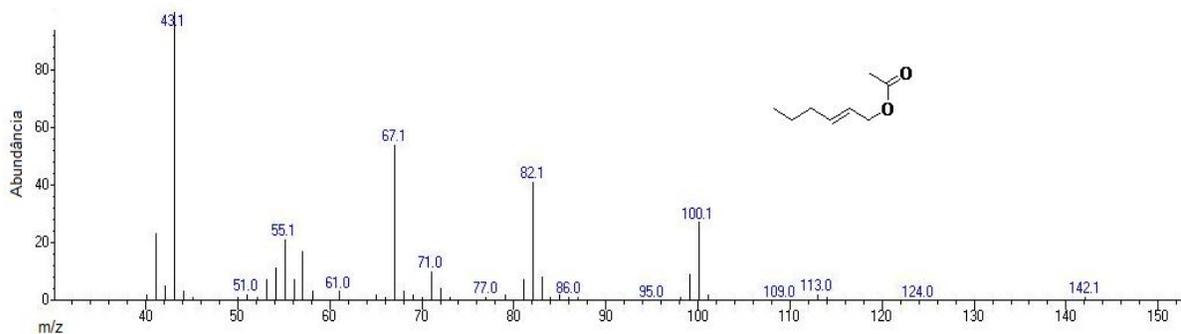
Anexo 28. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do acetato de (*Z*)-3-hexenila (**25**).



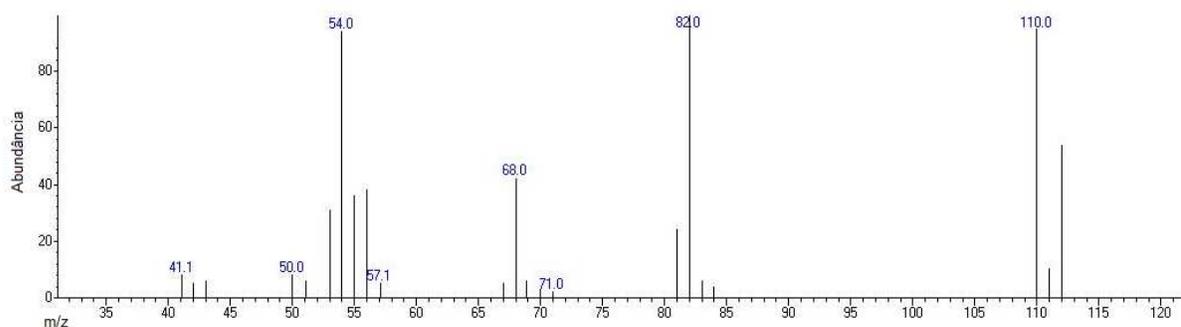
Anexo 29. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto acetato de (*Z*)-2-hexenila (**26**).



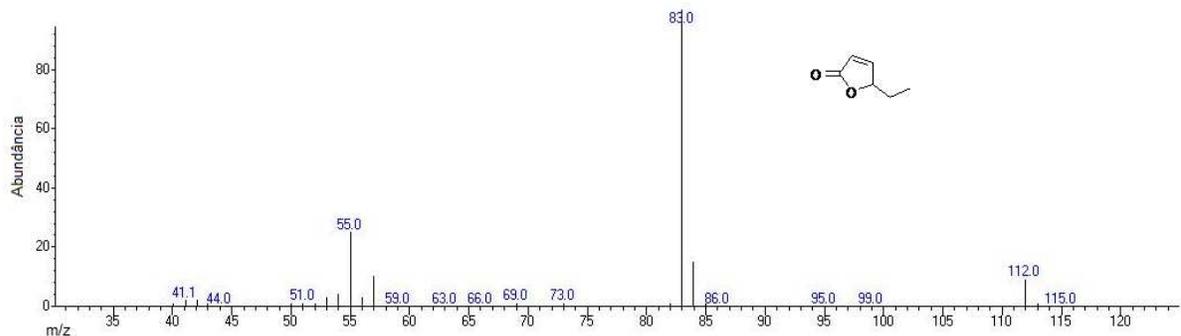
Anexo 30. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do acetato de hexila (**27**).



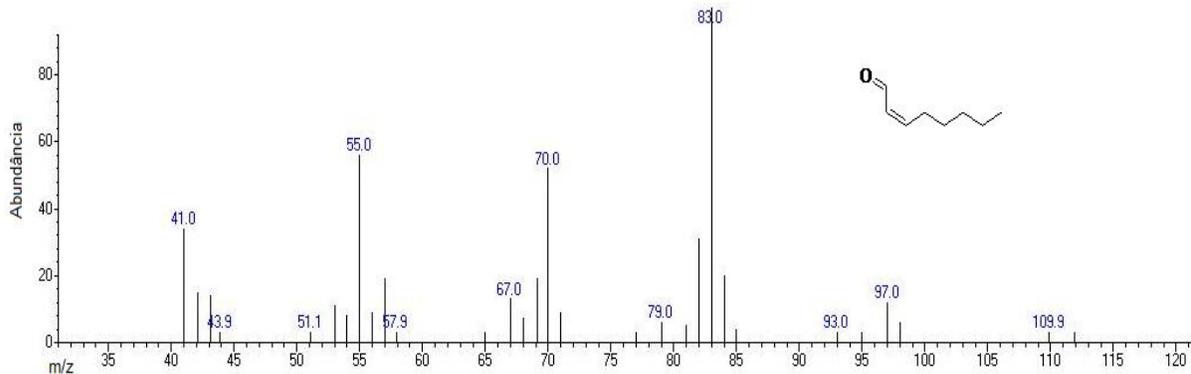
Anexo 31. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do acetato de (*E*)-2-hexenila (28).



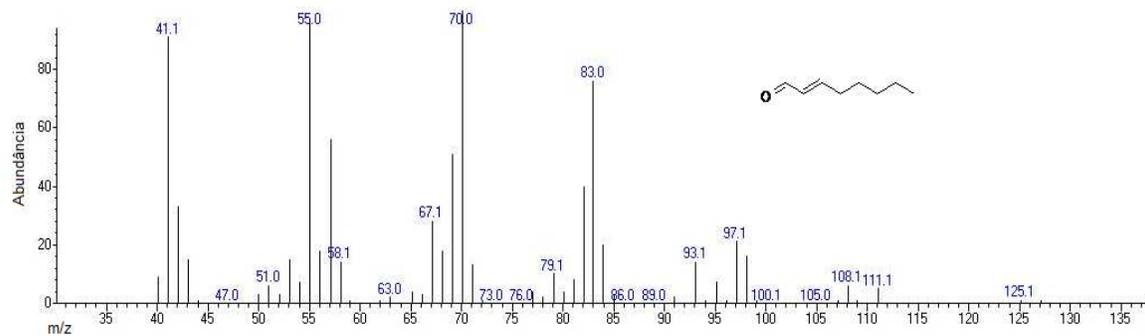
Anexo 32. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 29.



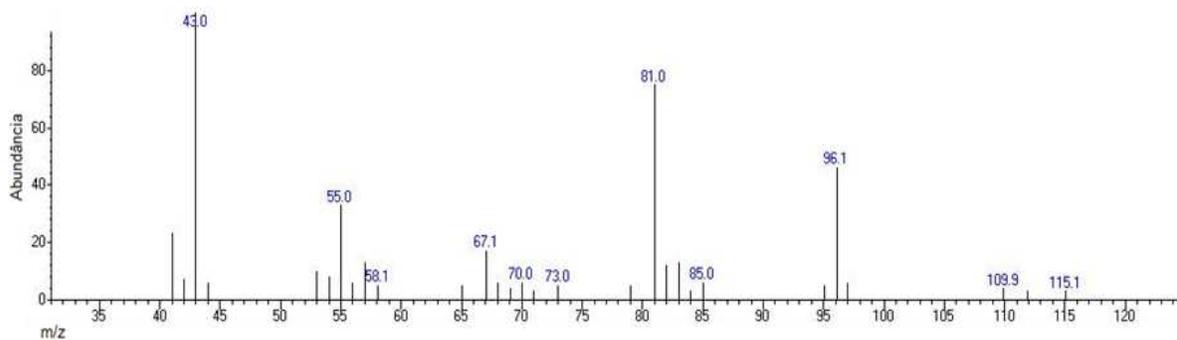
Anexo 33. Espectro de massas (CG-EM/SPME) da 5-etil-2(5H)-furanona (30).



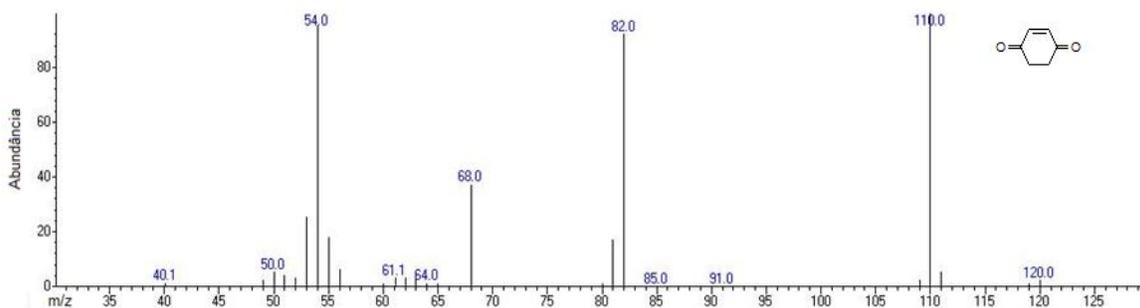
Anexo 34. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (*Z*)-2-octenal (31).



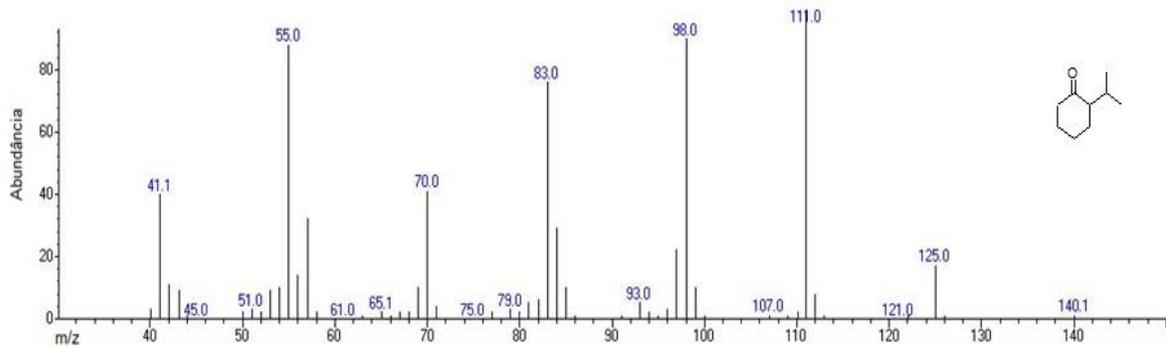
Anexo 35. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (*E*)-2-octenal (32).



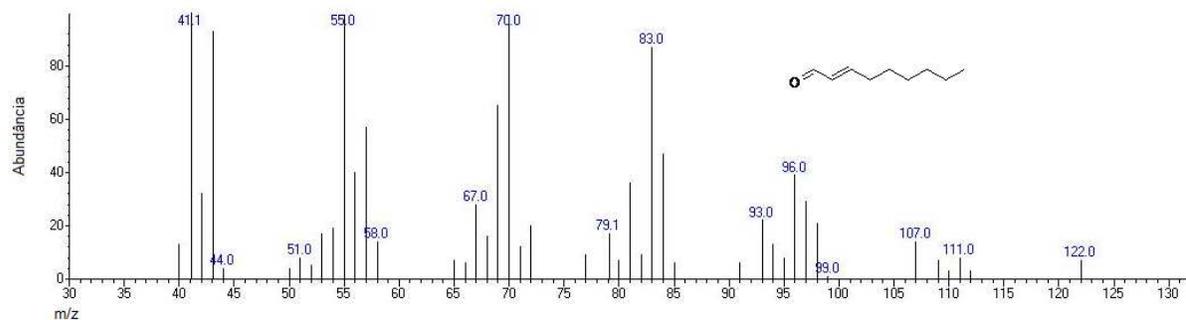
Anexo 36. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 33.



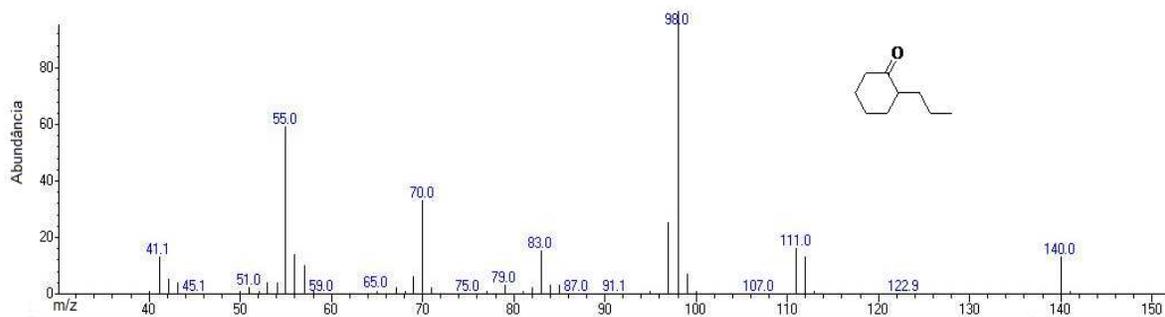
Anexo 37. Espectro de massas (CG-EM/SPME) da 2-cicloexene-1,4-diona(35).



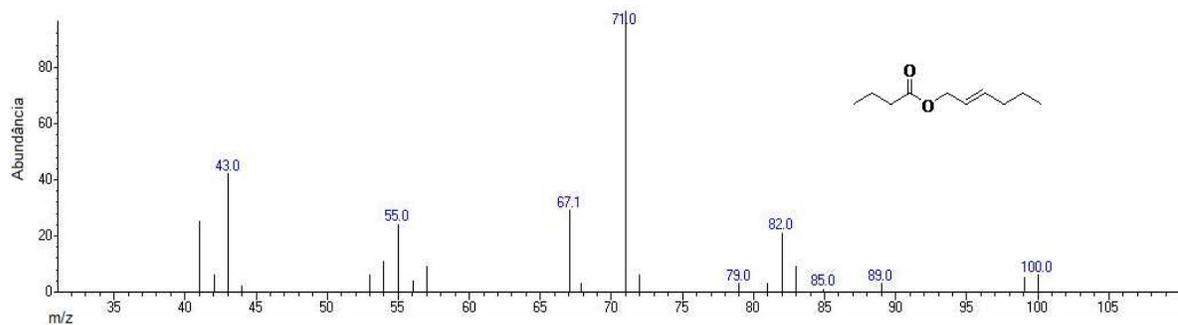
Anexo 38. Espectro de massas (CG-EM/SPME) da 2-isopropilciclohexanona (38).



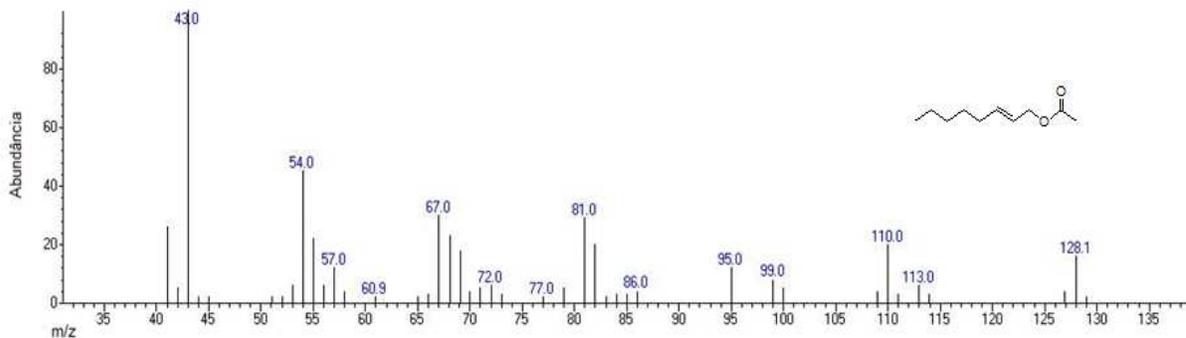
Anexo 39. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (*E*)-2-nonenal (**39**).



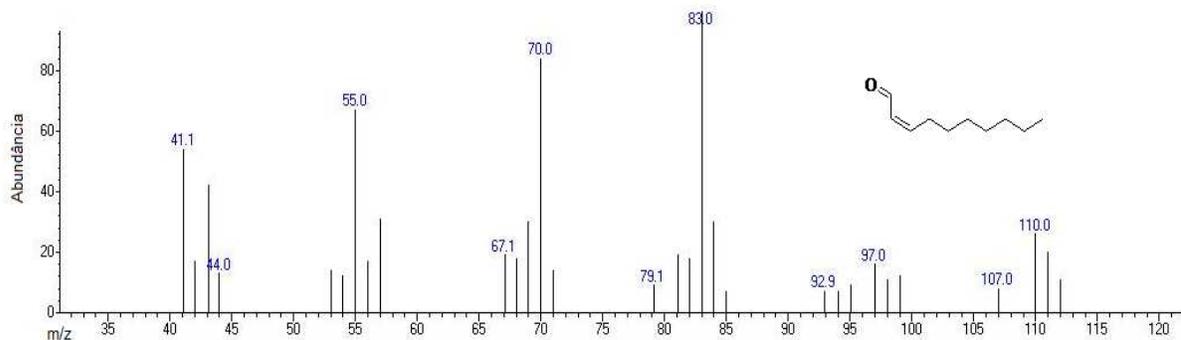
Anexo 40. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2-propilciclohexanona (**40**).



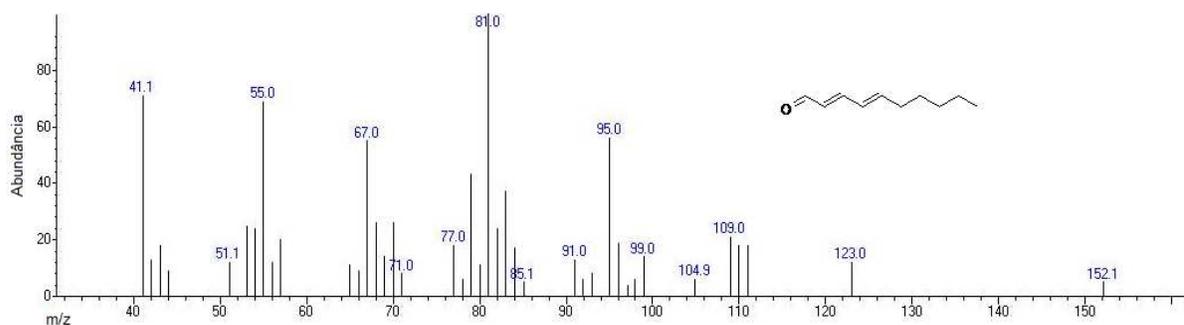
Anexo 41. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do butanoato de 2-hexenila (**41**).



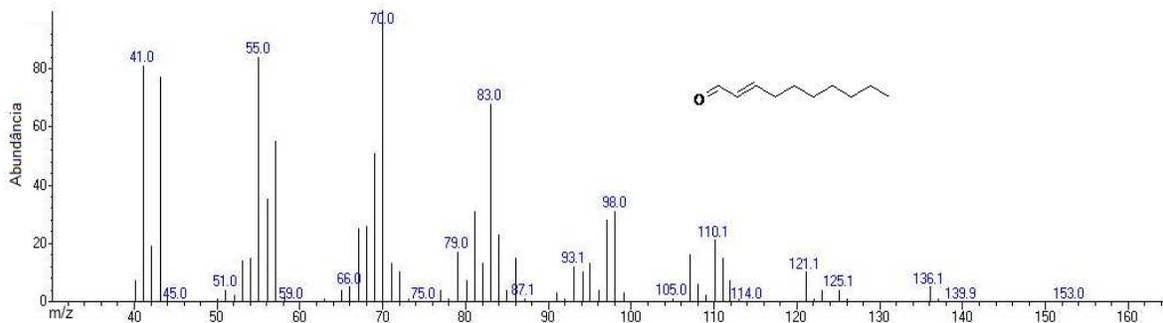
Anexo 42. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (*E*)-2-acetato de 2-octenila (**43**).



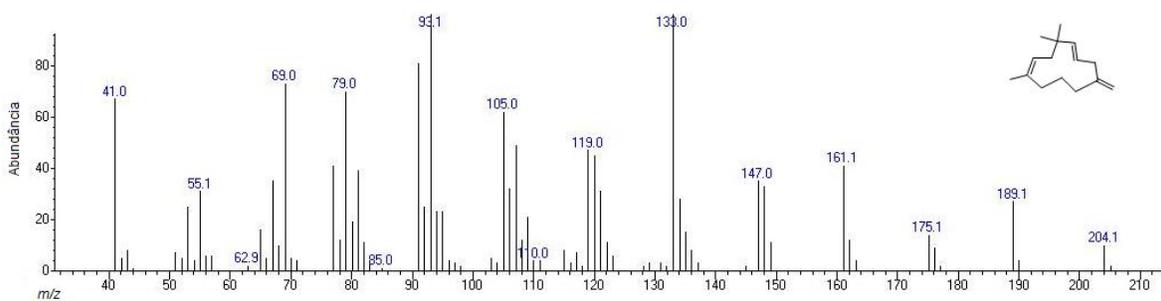
Anexo 43. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (Z)-2-decenal (44).



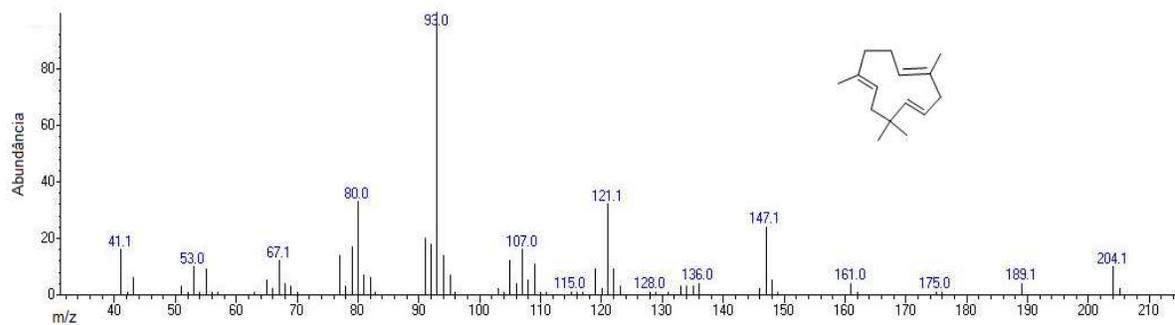
Anexo 44. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2,4-decadienal (45).



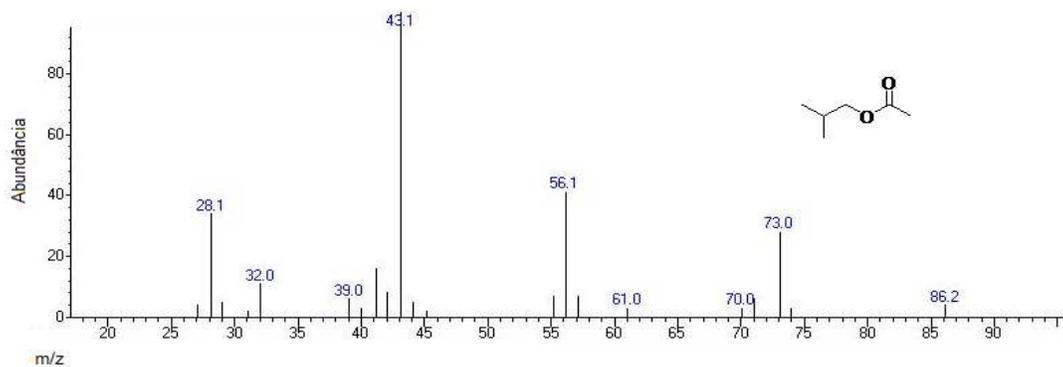
Anexo 45. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do (E)-2-decenal (46).



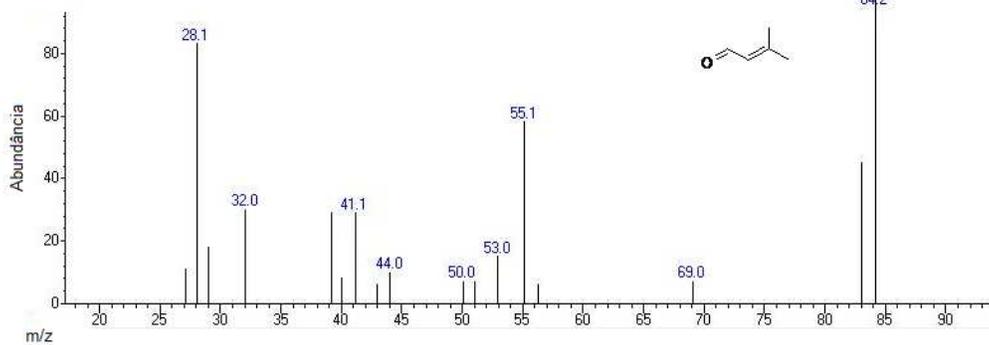
Anexo 46. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto β -humuleno (53).



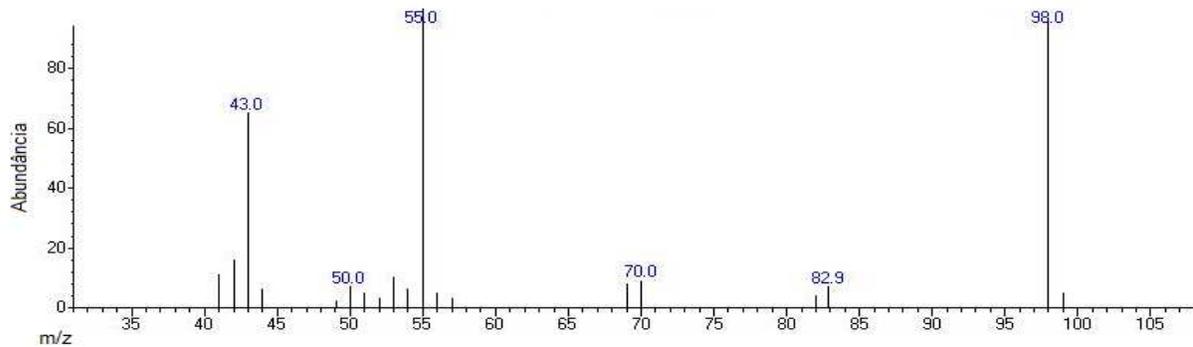
Anexo 47. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do α -cariofileno (54).



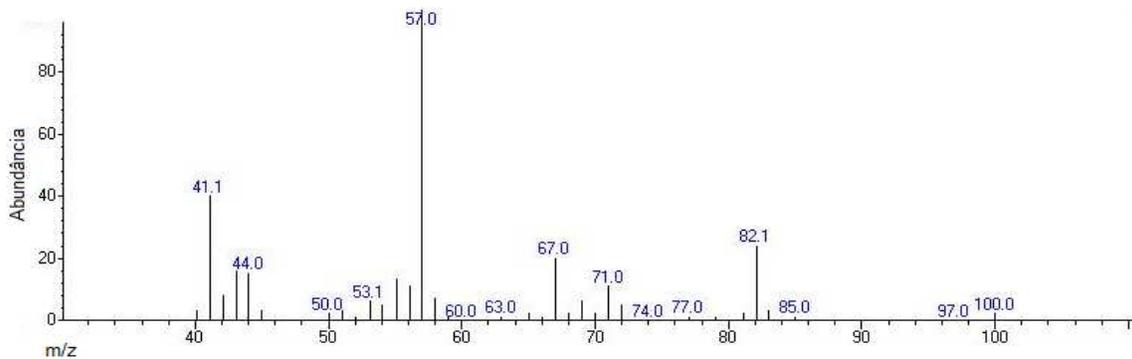
Anexo 48. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do acetato de 2-metilpropano (57).



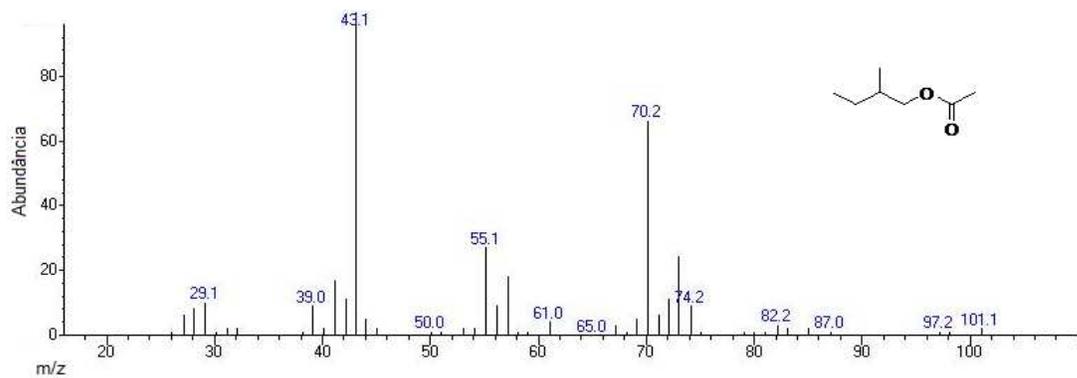
Anexo 49. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 3-metil 2-butenal (58).



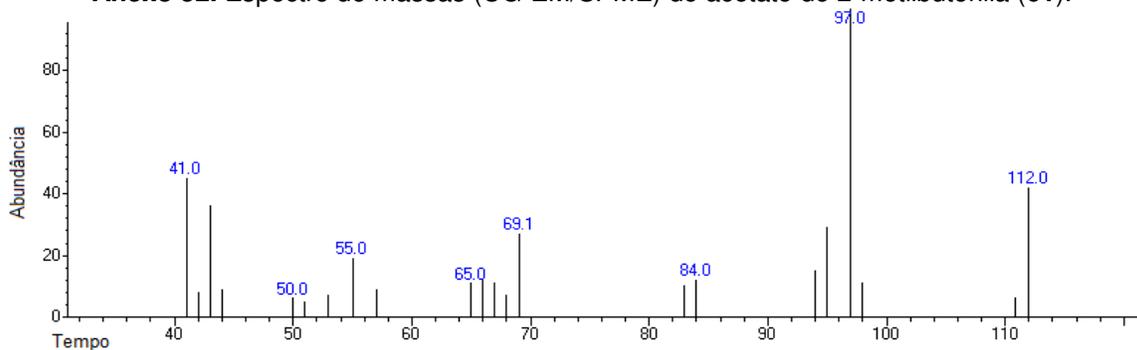
Anexo 50. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do isômero furanona (59).



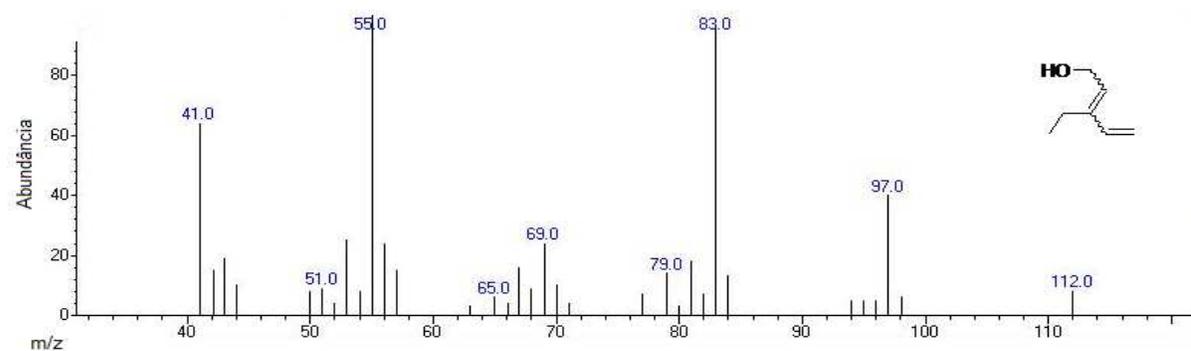
Anexo 51. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do isômero do hexenol (**60**).



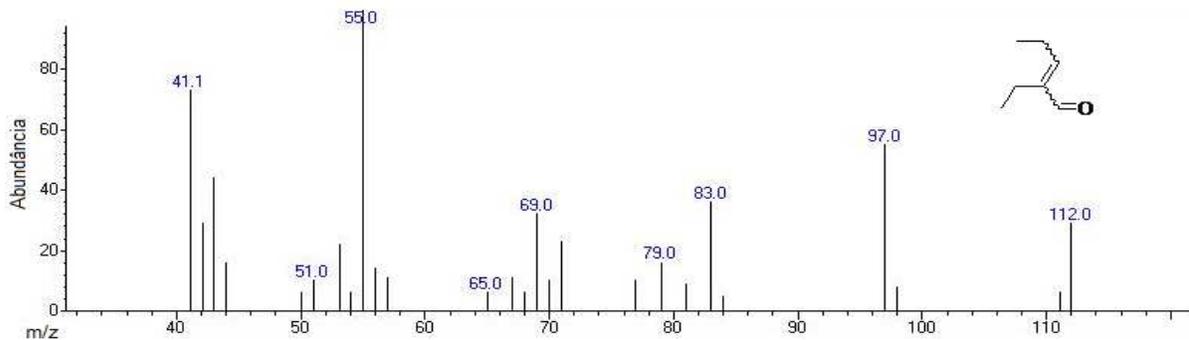
Anexo 52. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do acetato de 2-metilbutenila (**61**).



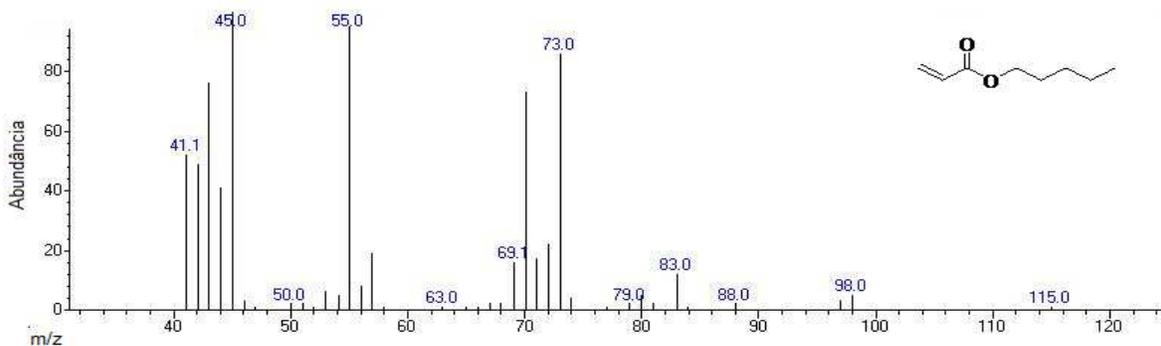
Anexo 53. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto **62**.



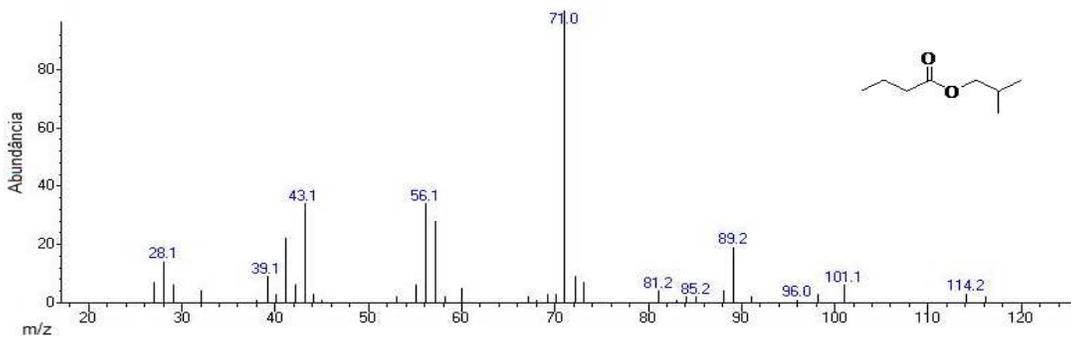
Anexo 54. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 3-etil-2,4-pentadien-1-ol (**63**).



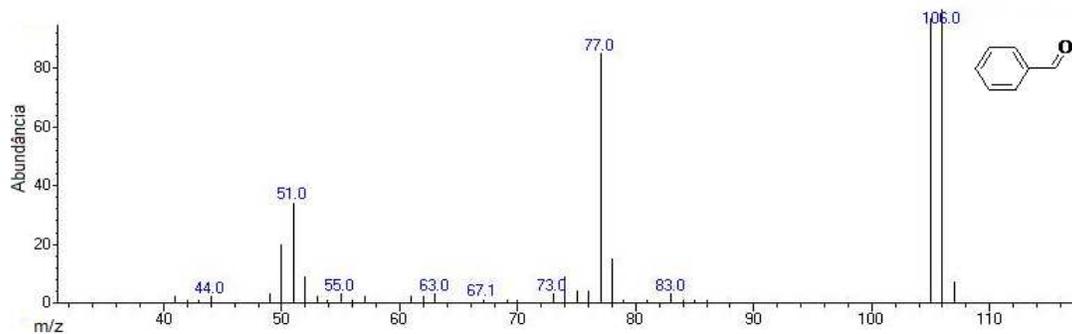
Anexo 55. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2-etil-2-pentenal (64).



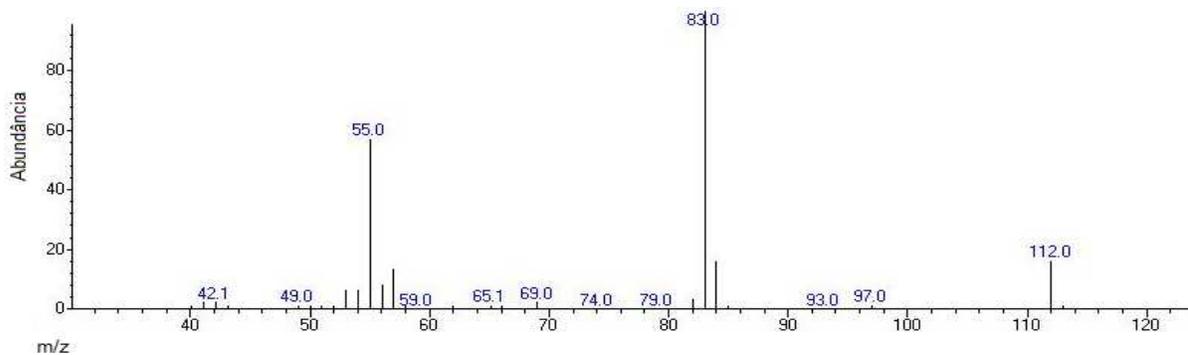
Anexo 56. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2-propenoato de pentila (65).



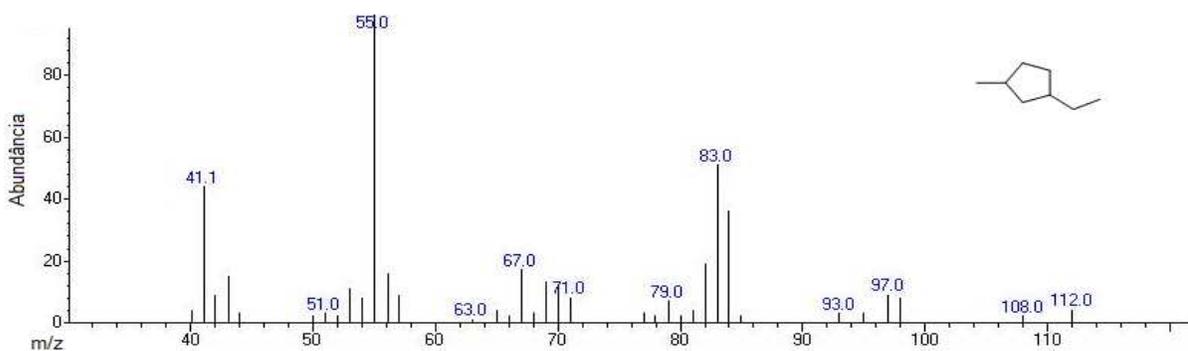
Anexo 57. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do butanoato de 2-metilpropila (66).



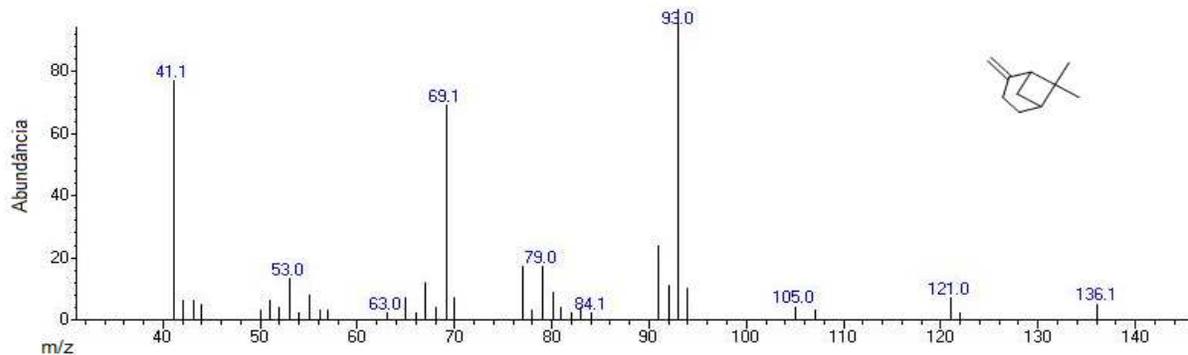
Anexo 58. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do benzaldeído (68).



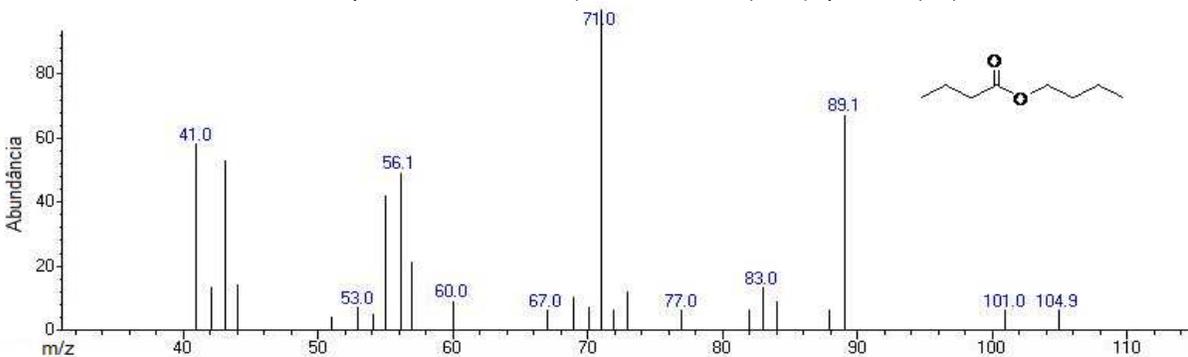
Anexo 59. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do isômero do furano (**69**).



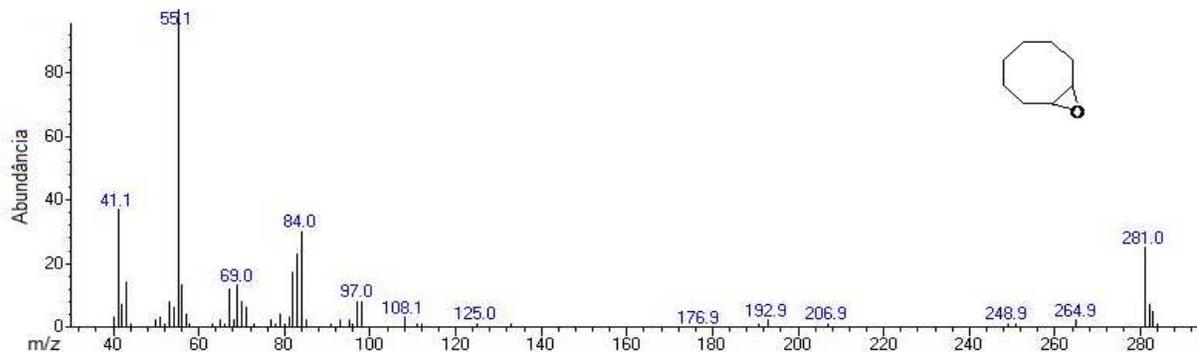
Anexo 60. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 3-metil-1-etilciclopentano (**70**).



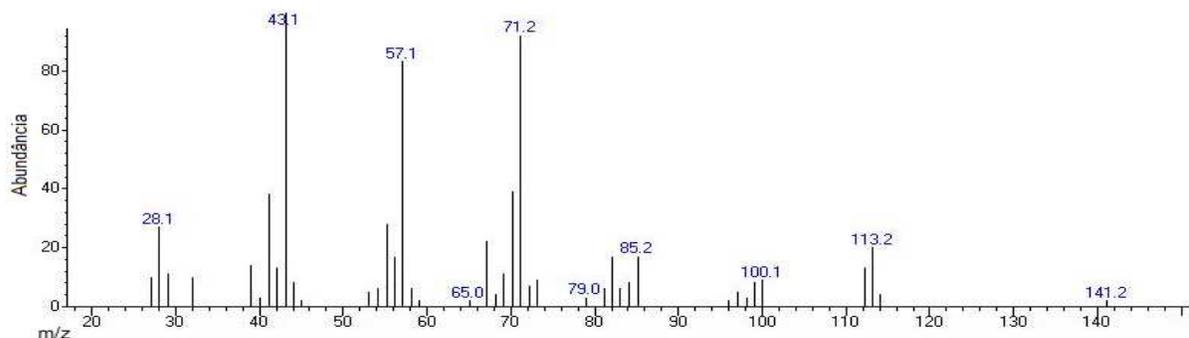
Anexo 61. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do β -pineno (**71**).



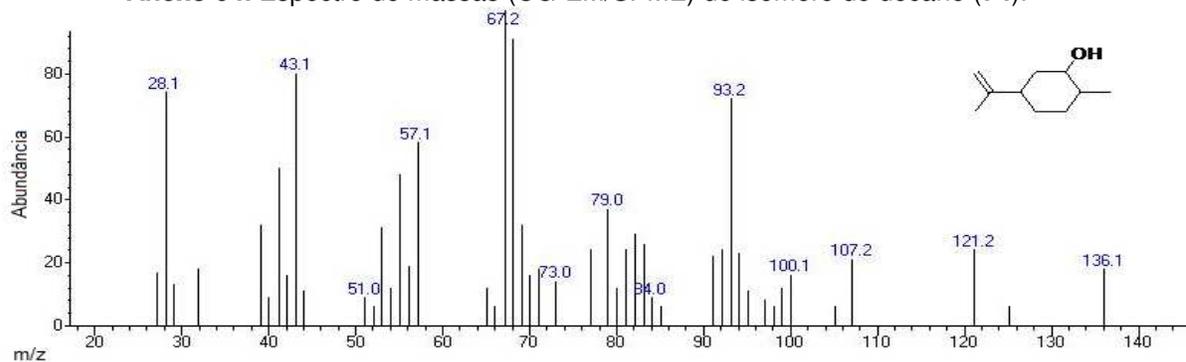
Anexo 62. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do butanoato de butila (**72**).



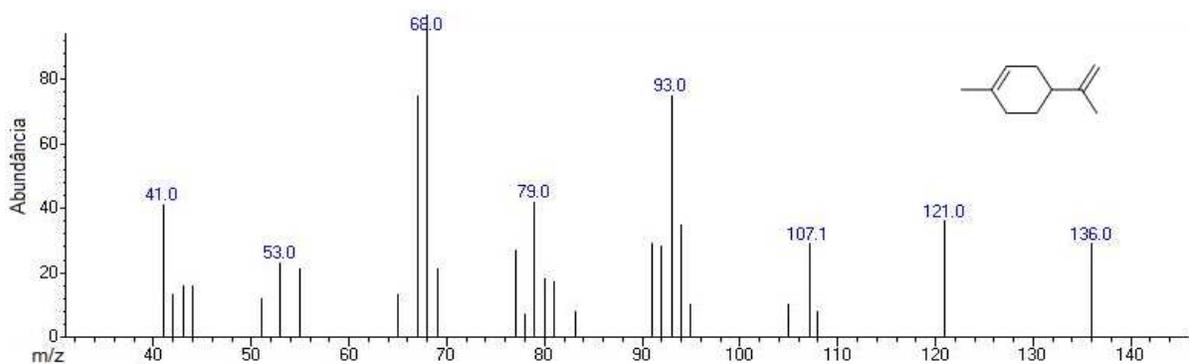
Anexo 63. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 73.



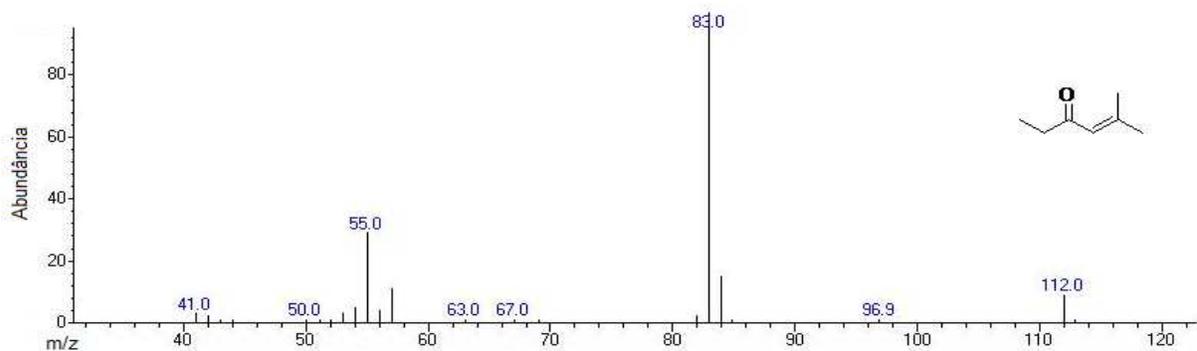
Anexo 64. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do isômero do decano (74).



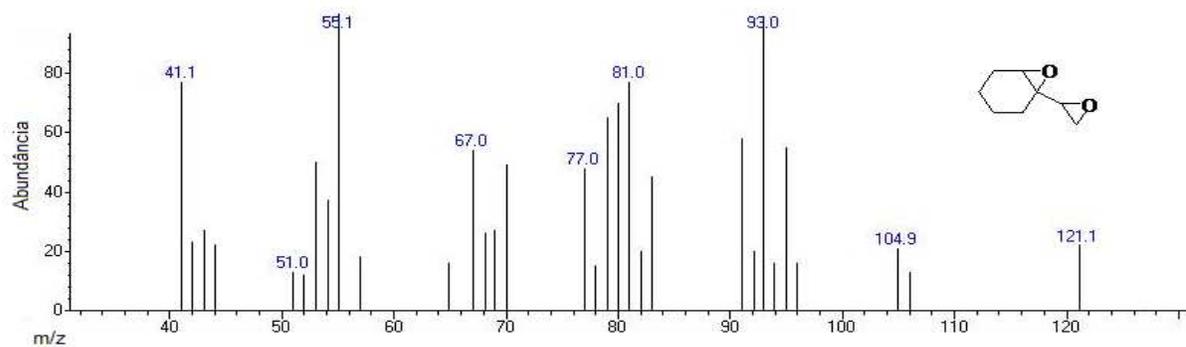
Anexo 65. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 2-metil-5-(2-metil-2-propenila)-ciclohexanol (75).



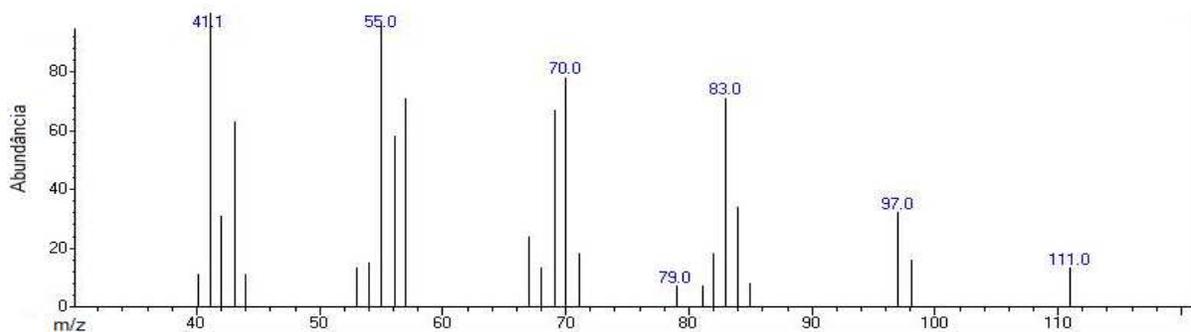
Anexo 66. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do limoneno (76).



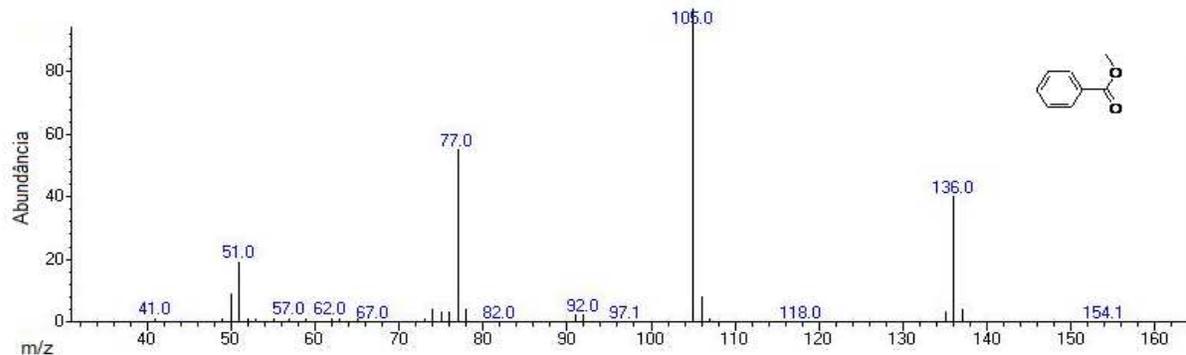
Anexo 67. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 5-metil-4-hexen-3-ona (77).



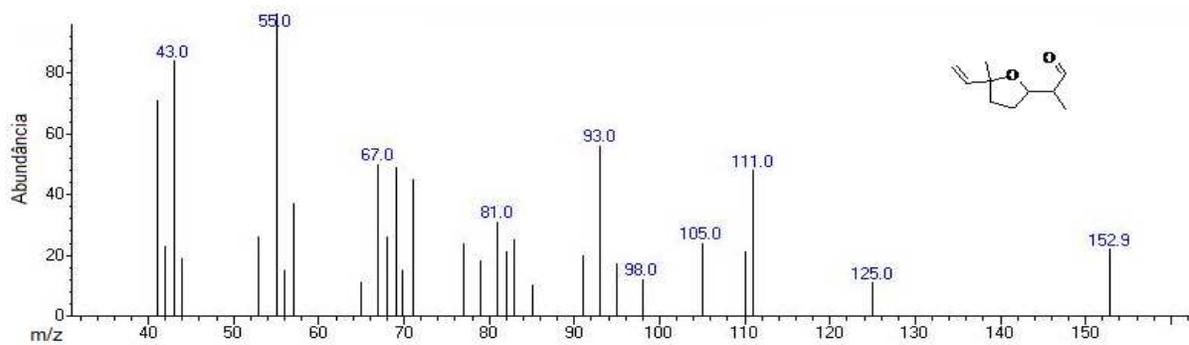
Anexo 68. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do 3-oxiranil-7-oxabicyclo(4.1.0)heptano (78).



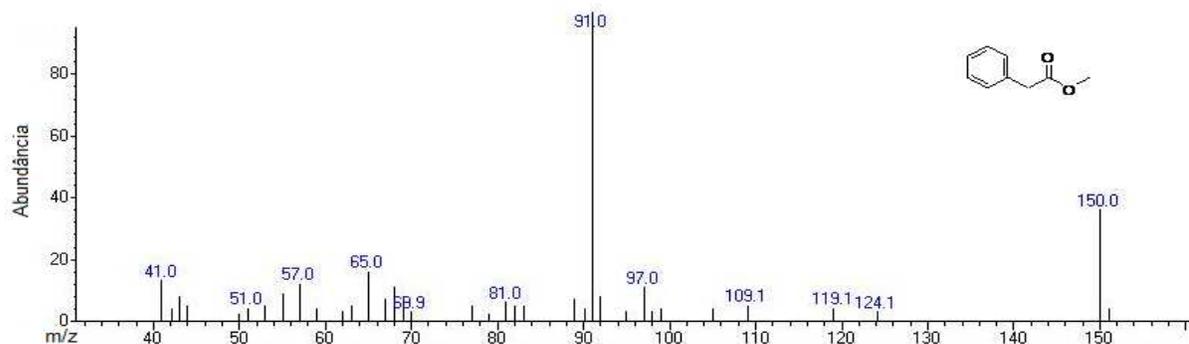
Anexo 69. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 79.



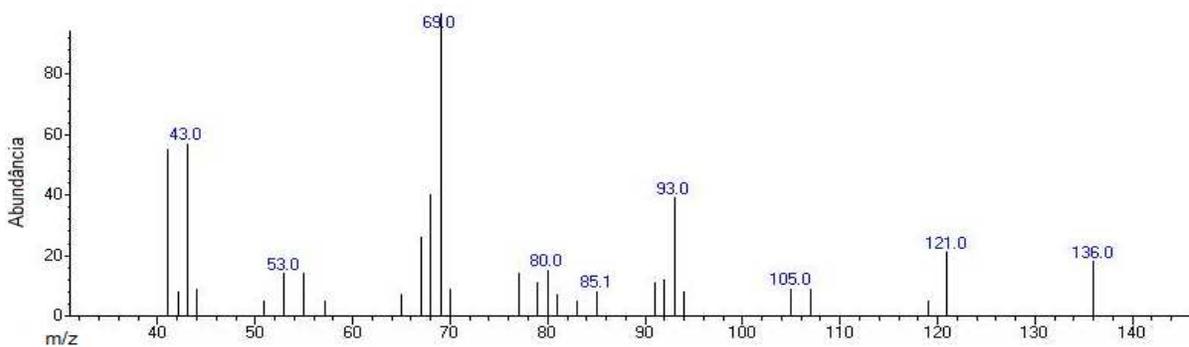
Anexo 70. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do éster metílico do ácido benzóico (80).



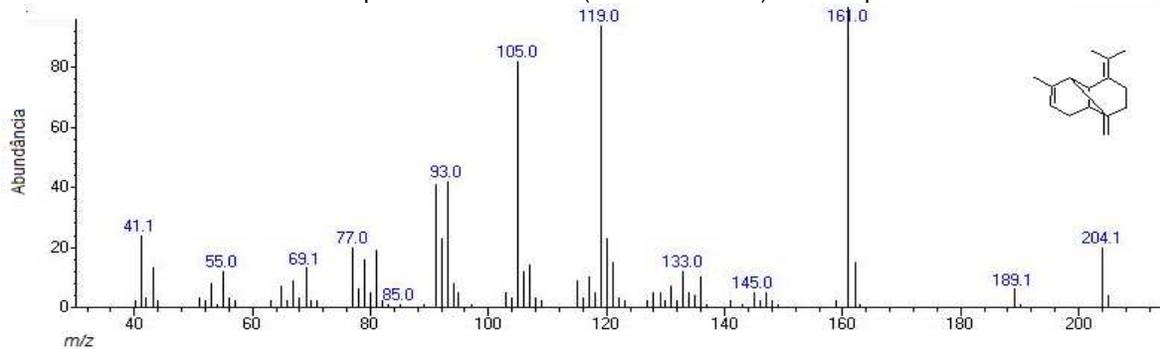
Anexo 71. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do aldeído "lilalic" (81).

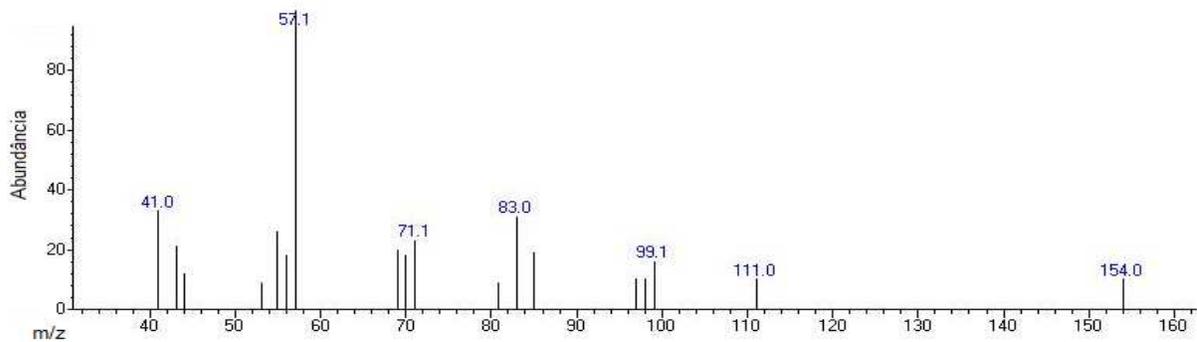
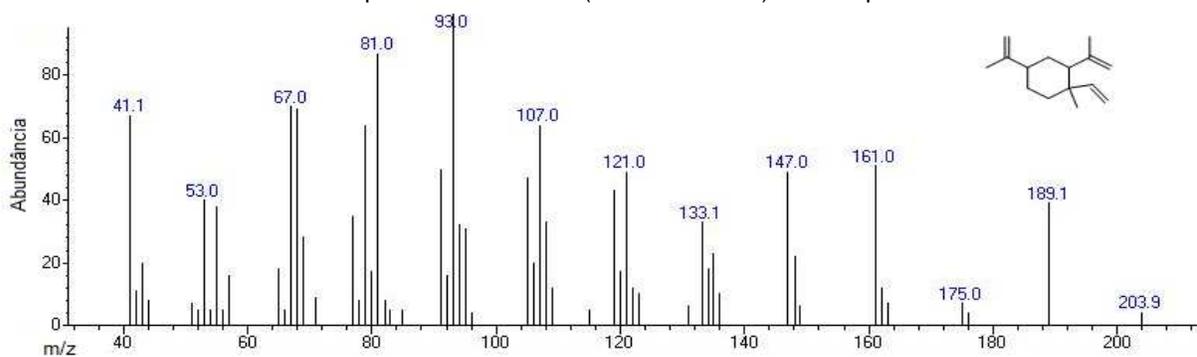
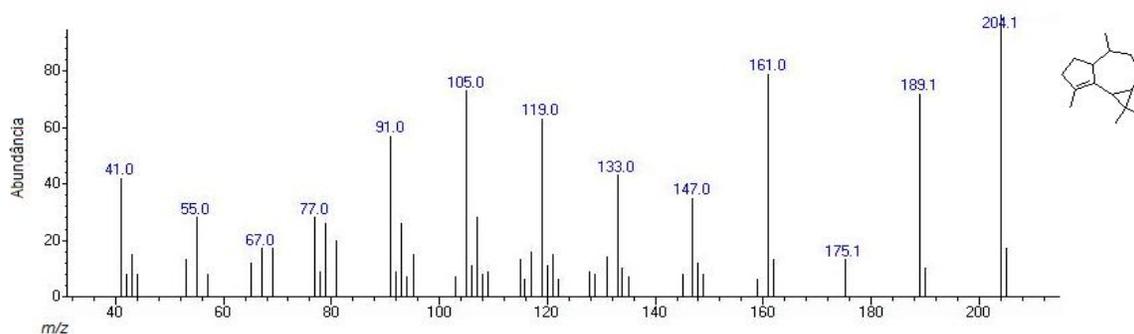
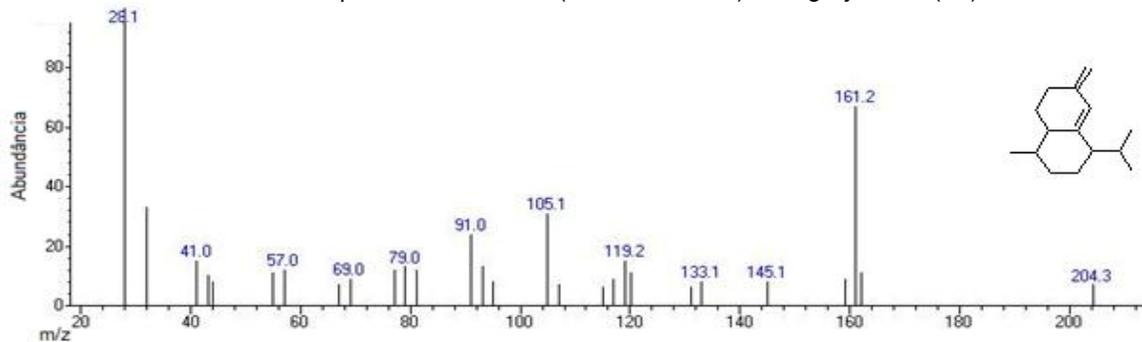


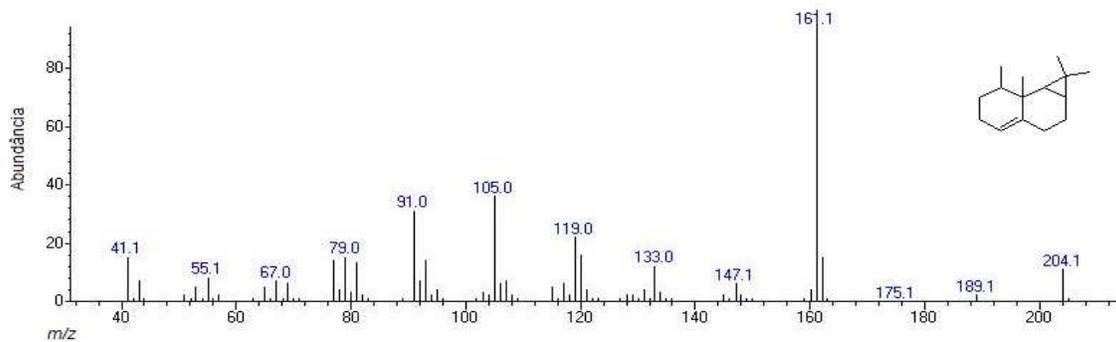
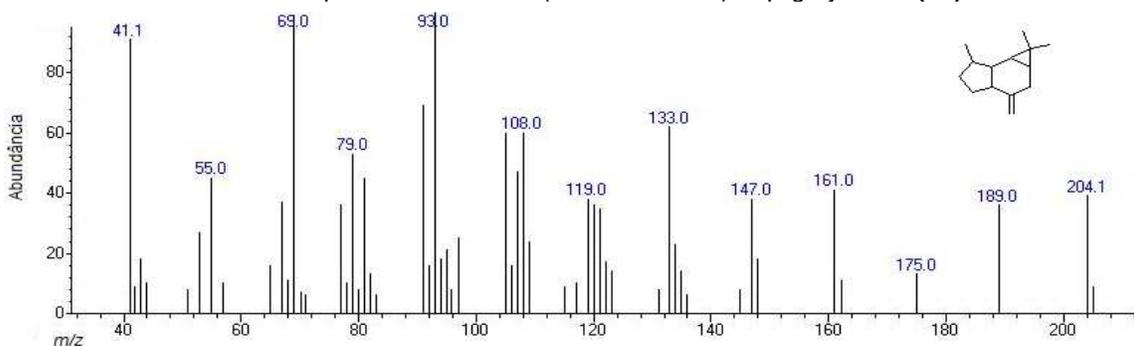
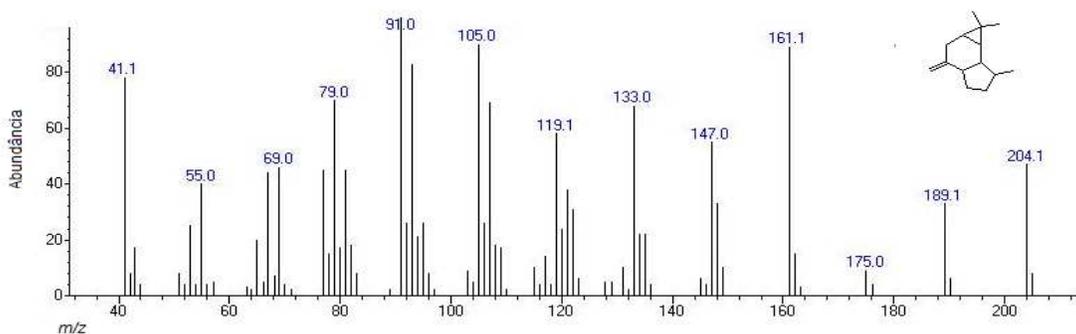
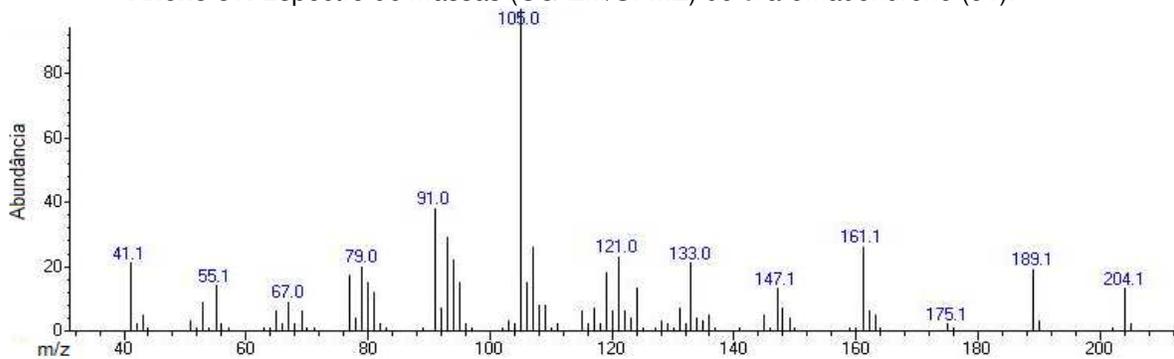
Anexo 72. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do fenilacetato de metila (82).



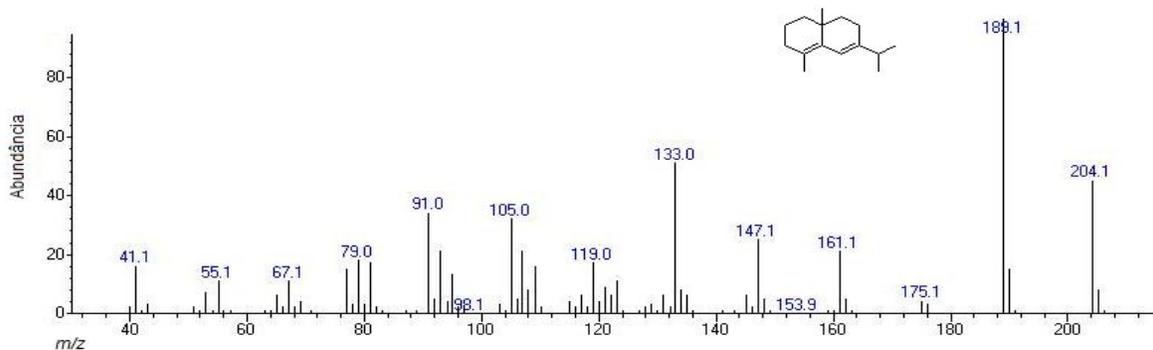
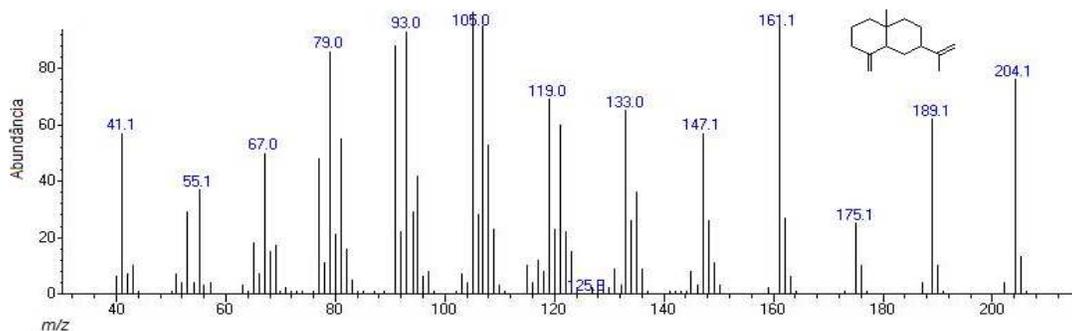
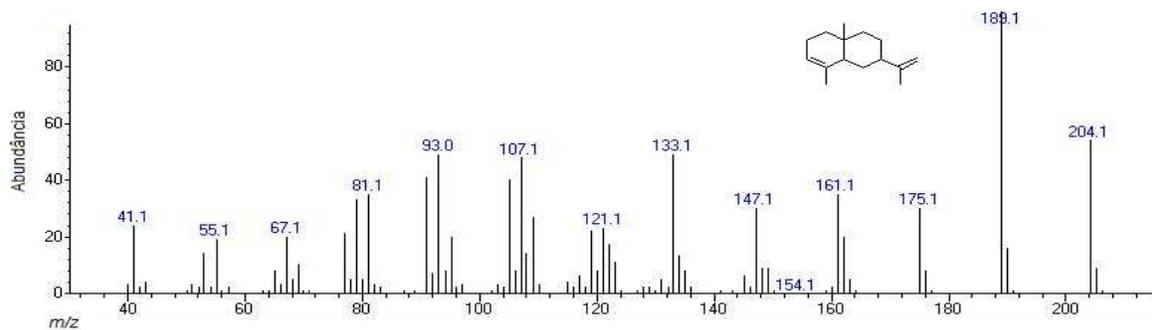
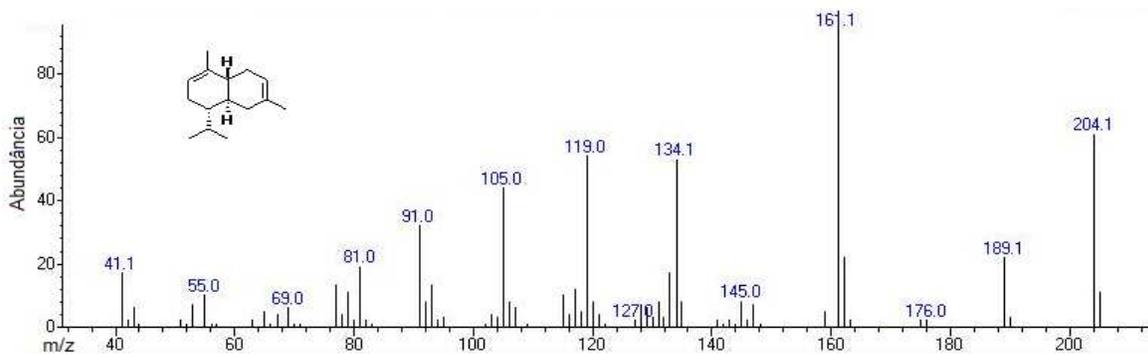
Anexo 73. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 83.

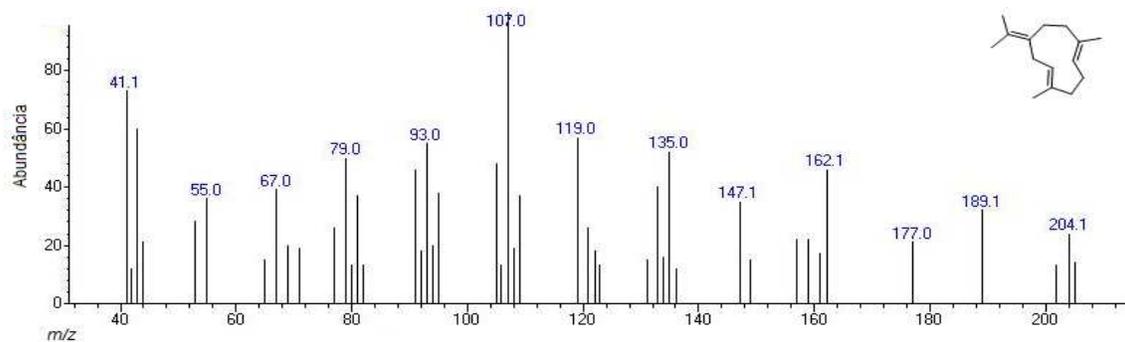
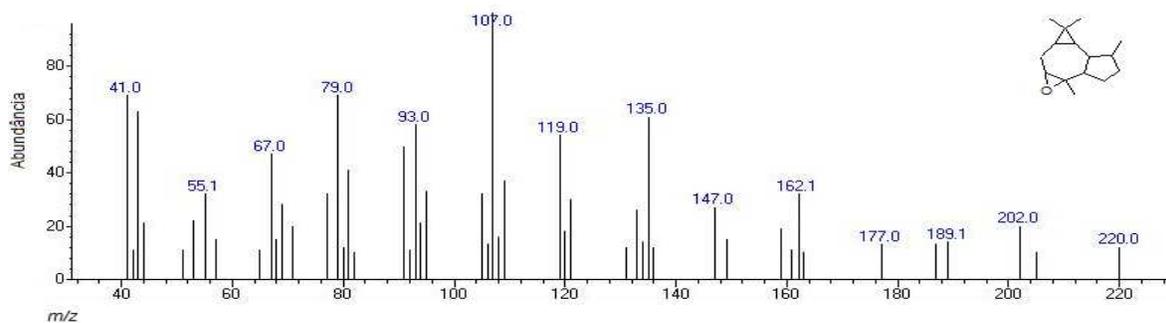
Anexo 74. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do α -copaeno (84).

Anexo 75. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto **85**.Anexo 76. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do β -elemeno (**86**).Anexo 77. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do α -gurjuneno (**87**).Anexo 78. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do epi-biciclosesquifelandreno (**88**).

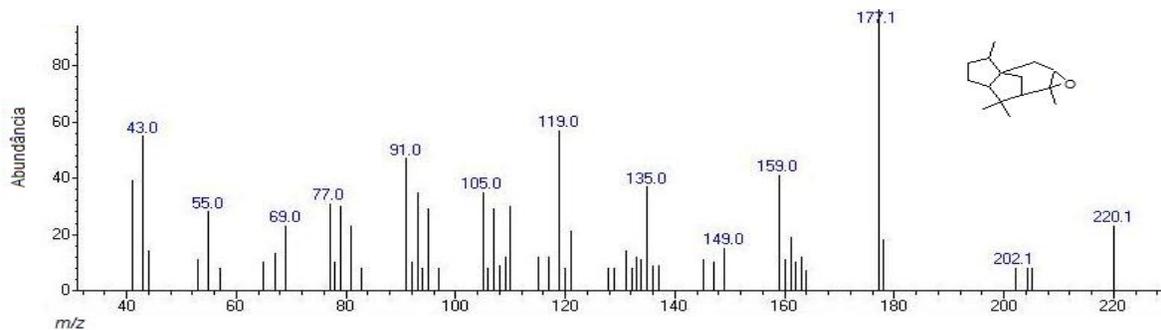
Anexo 79. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do β -gurjuneno (89).Anexo 80. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do β -aromadendreno (90).Anexo 81. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do α -aromadendreno (91).

Anexo 82. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do composto 92.

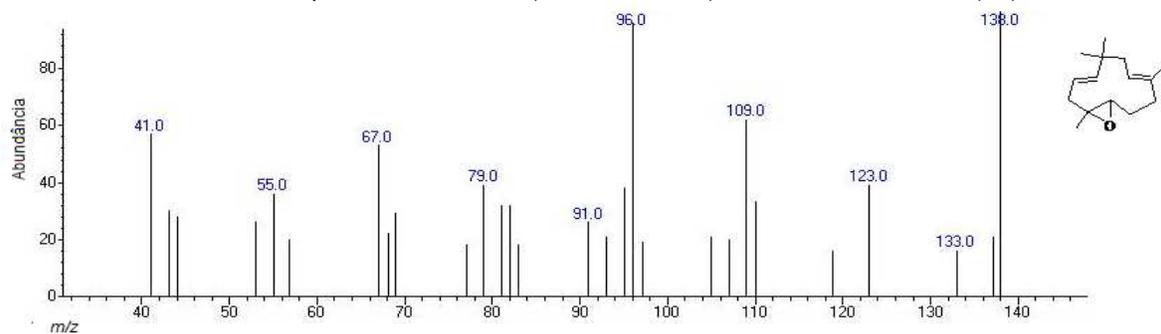
Anexo 83. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do δ -selineno (93).Anexo 84. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do β -selineno (94).Anexo 85. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do α -selineno (95).Anexo 86. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do β -cadineno (96).

Anexo 87. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do β -germacreno (97).

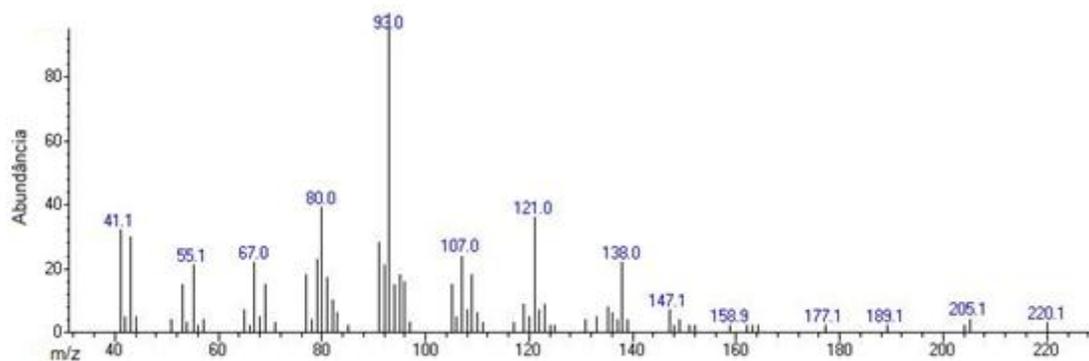
Anexo 88. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do epóxido de isoromadendreno (98).



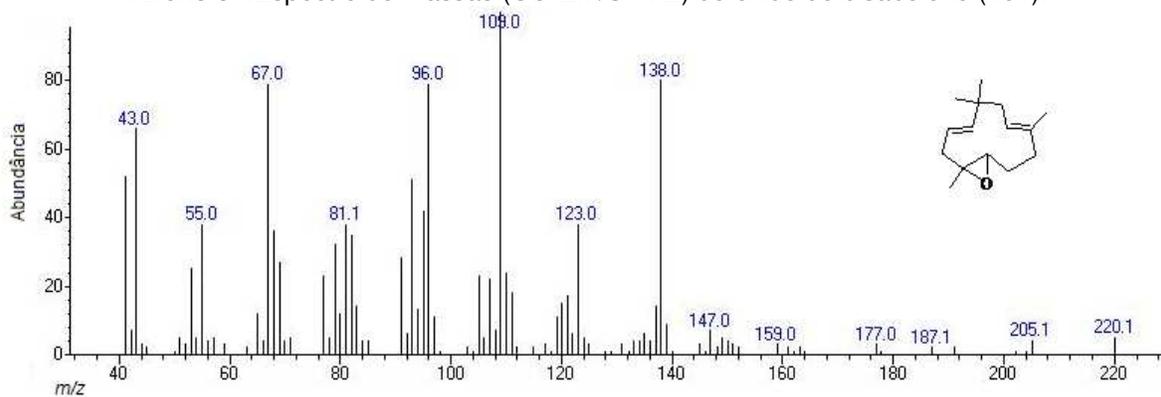
Anexo 89. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do óxido de cedreno (99).



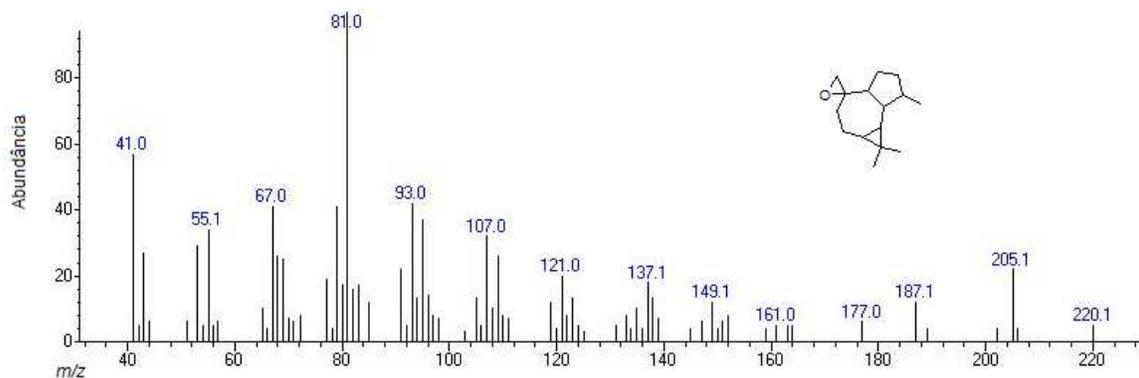
Anexo 90. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do epóxido de humuleno II (100).



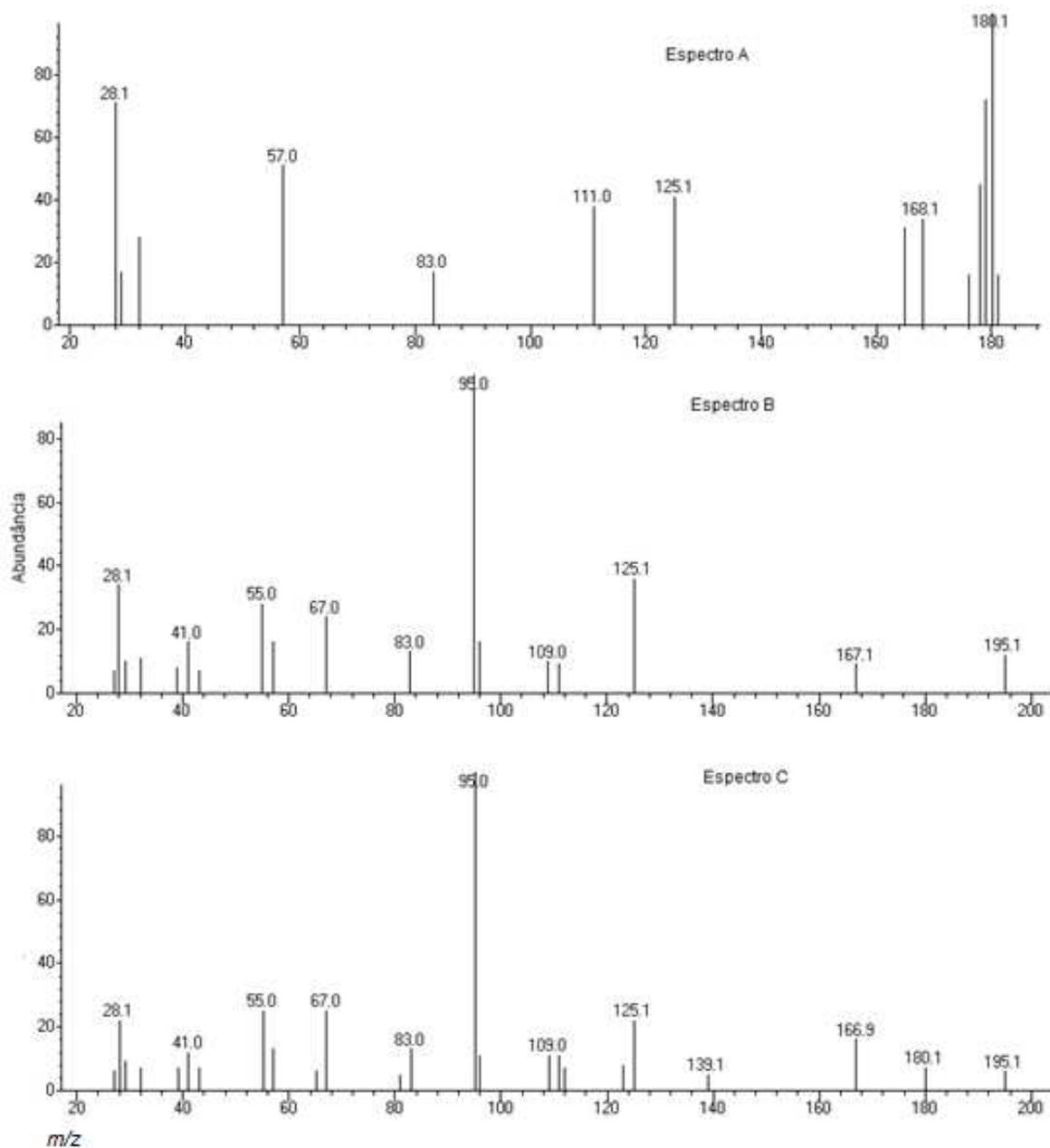
Anexo 91. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do óxido de bisaboleno (**101**).



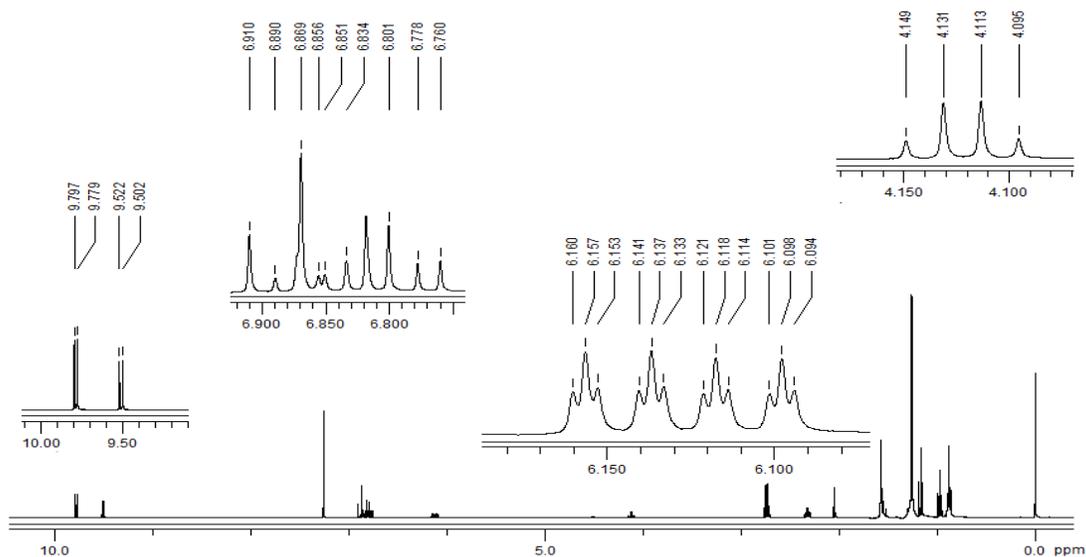
Anexo 92. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do óxido humuleno III (**102**).



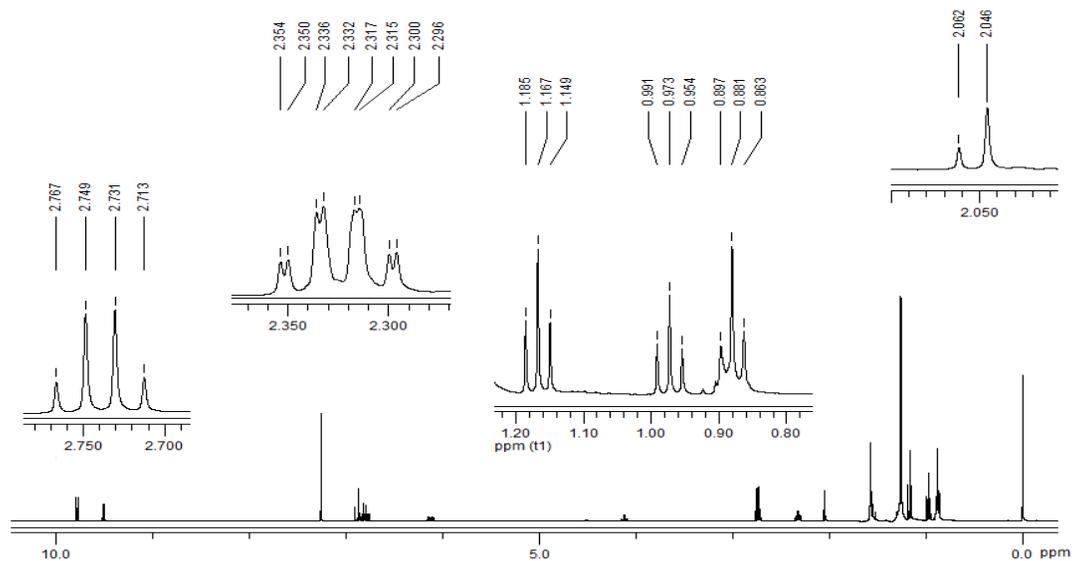
Anexo 93. Espectro de massas (CG-EM/SPME) do epóxido de allo-aromadendreno (**103**).



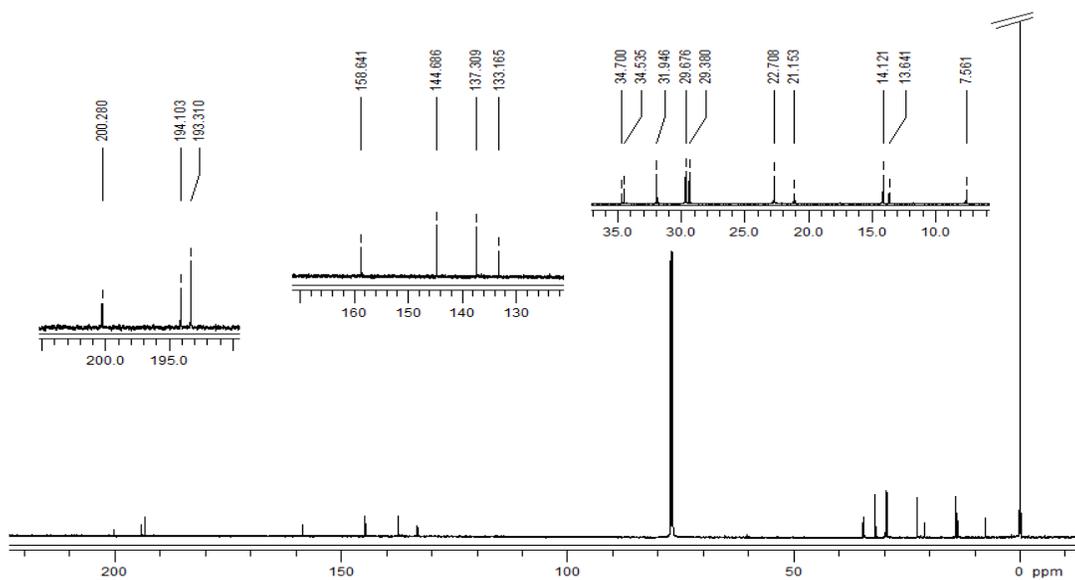
Anexo 94. Espectros de massas obtidos por (CG-EM) dos compostos desconhecidos (A, B e C) detectados nas análises de exúvias de 4^o ínstar de *Phloea subquadrata*.



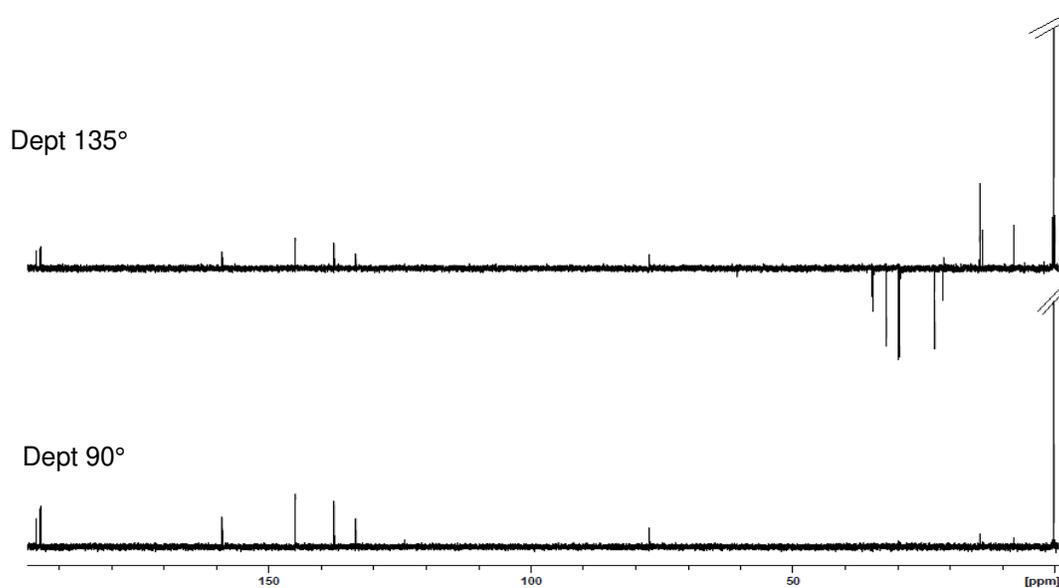
Anexo 95. Espectro de RMN de ^1H (400,18 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula Macho de *Phloea subquadrata*: Expansão A. Processamento realizado no programa *MestRec*.



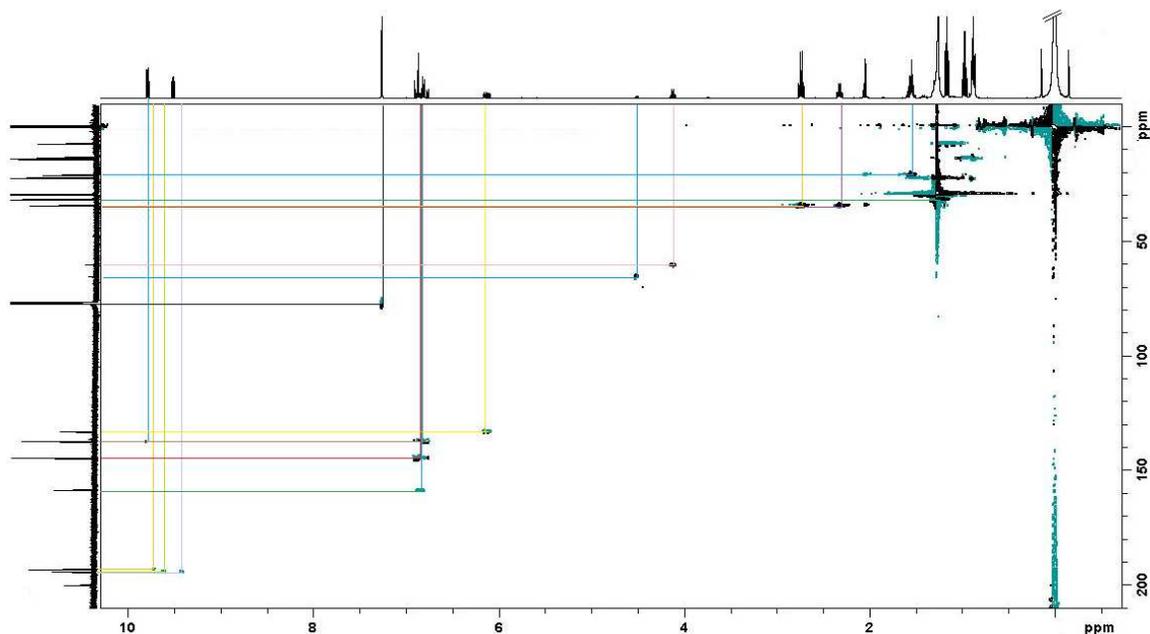
Anexo 96. Espectro de RMN de ^1H (400,18 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula macho de *Phloea subquadrata*: Expansão B. Processamento realizado no programa *MestRec*.



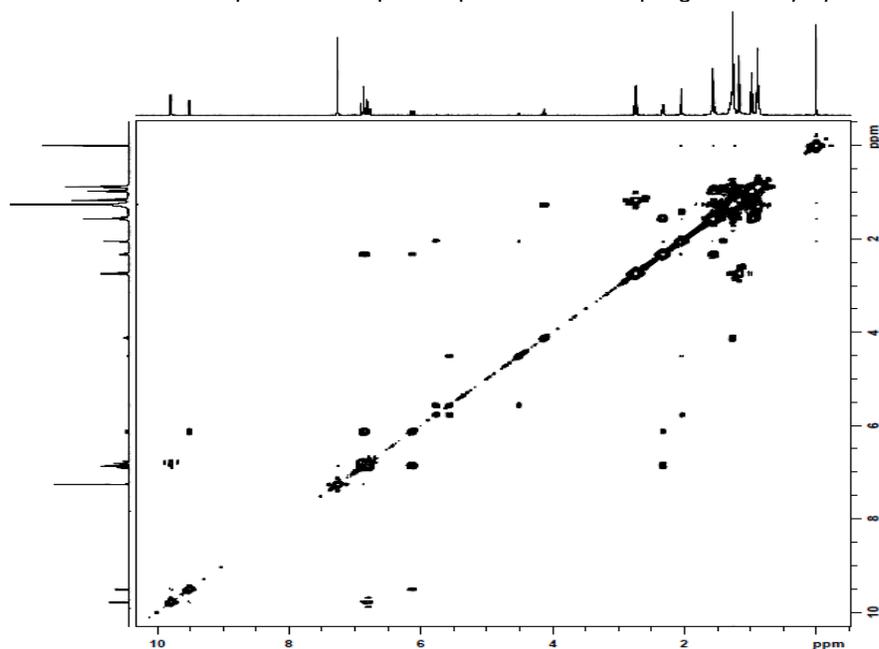
Anexo 97. Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula macho de *Phloea subquadrata*. Processamento realizado no programa *MestRec*.



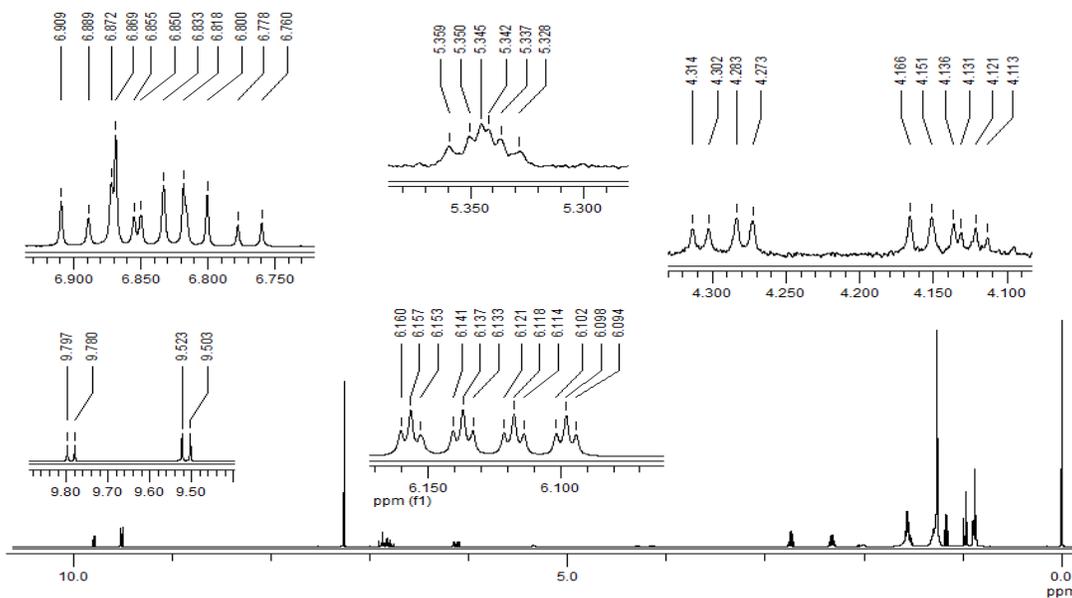
Anexo 98. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (125,69 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula macho de *Phloea subquadrata*. Espectro processado no programa *TopSpin* da Bruker.



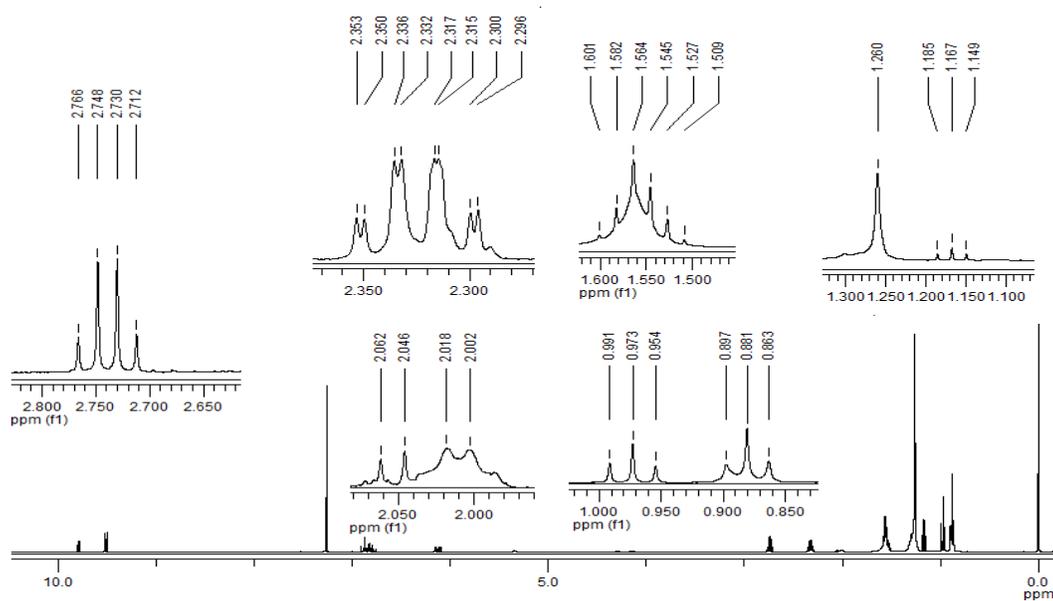
Anexo 99. Mapa de contorno de RMN de 2D ^1H - ^{13}C - HSQC(400,18 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula macho de *Phloea subquadrata*. Espectro processado no programa *TopSpin* da Bruker.



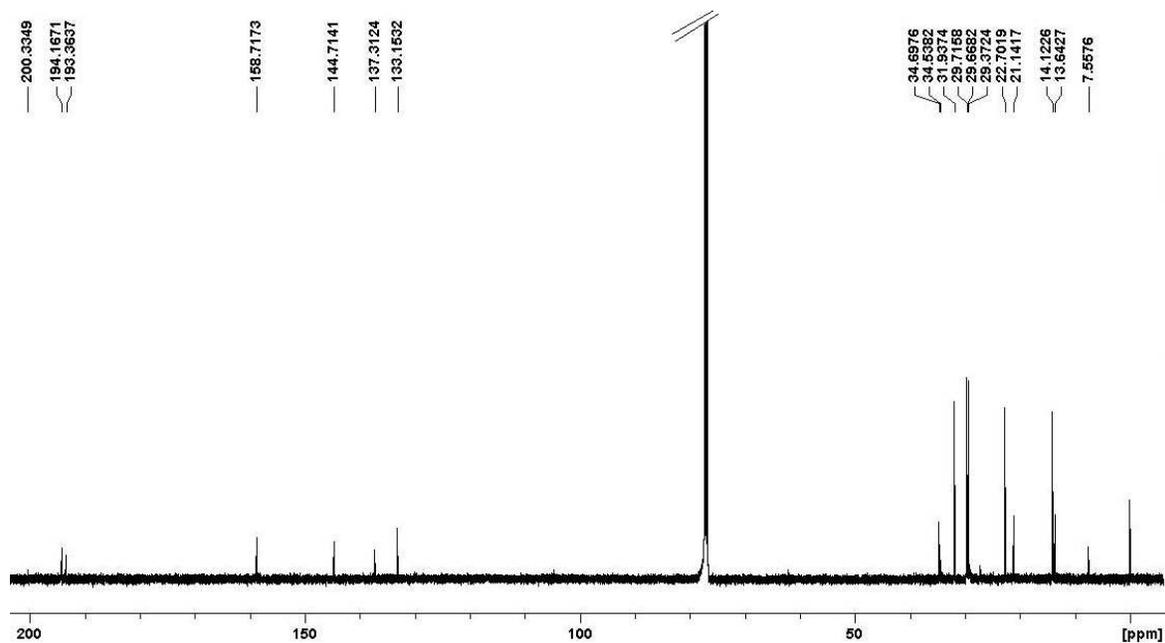
Anexo 100. Mapa de contorno de RMN de 2D ^1H - ^1H - COSY(400,18 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula Macho de *Phloea subquadrata*. Espectro processado no programa *TopSpin* da Bruker.



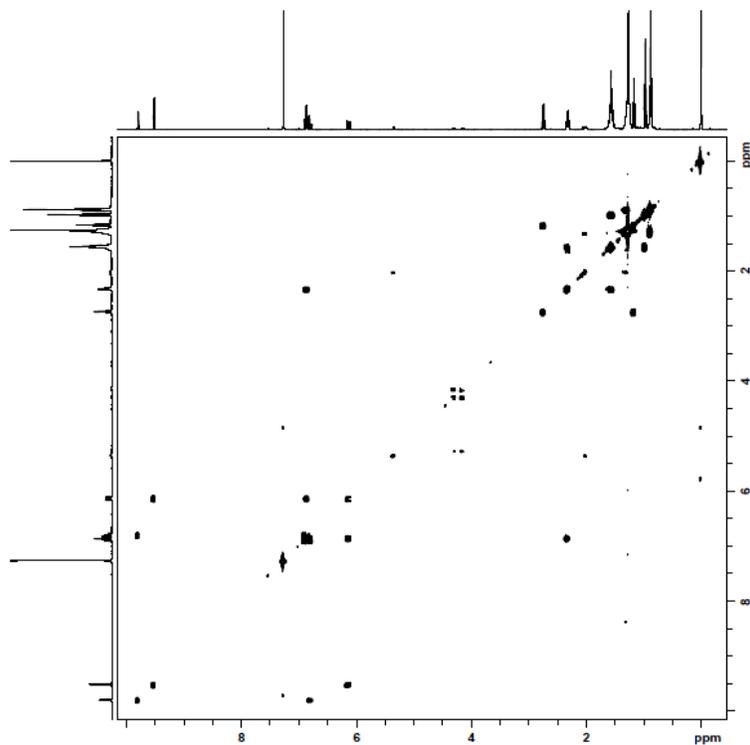
Anexo 101. Espectro de RMN de ^1H (400,18 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula fêmea de *Phloea subquadrata*: Expansão A. Processamento realizado no programa *MestRec*.



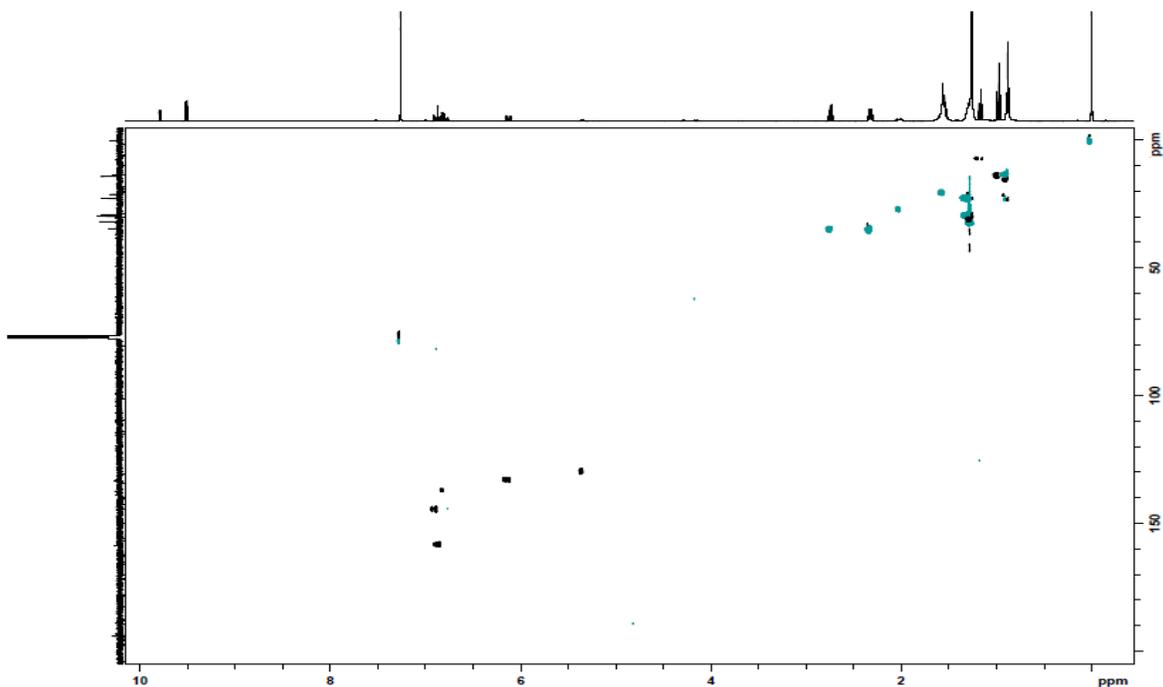
Anexo 102. Espectro de RMN de ^1H (400,18 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula fêmea de *Phloea subquadrata*: Expansão B. Processamento realizado no programa *MestRec*.



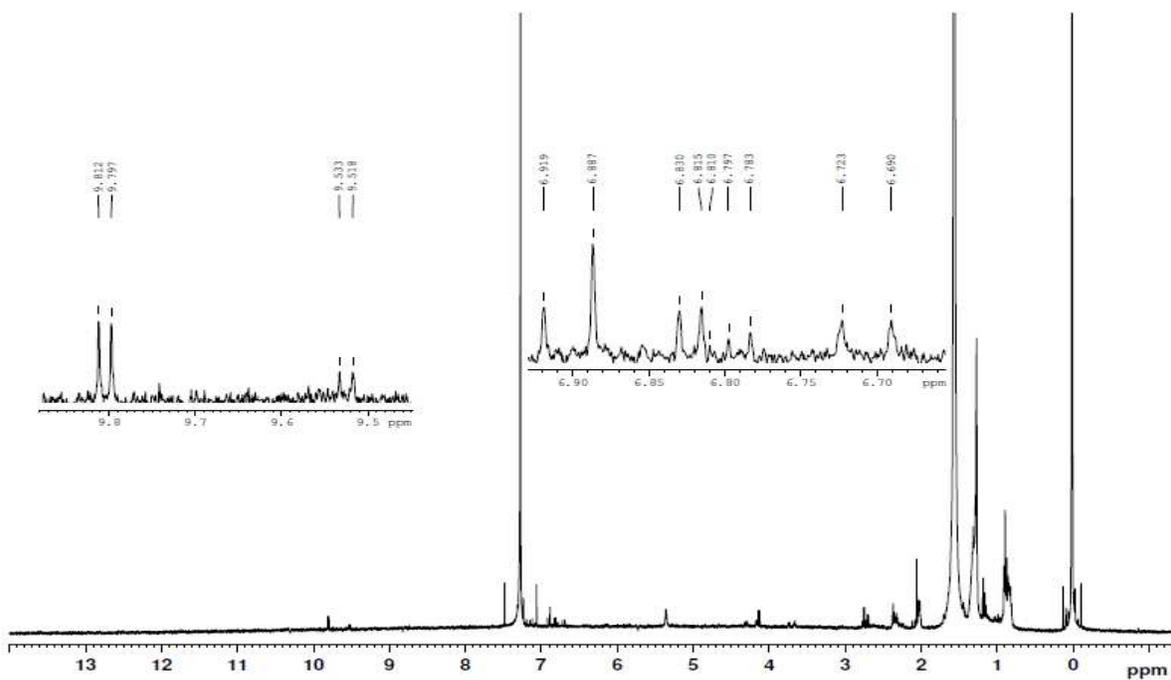
Anexo 103. Espectro de RMN de ^{13}C (100,63 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula fêmea de *Phloea subquadrata*. Espectro processado no programa *TopSpin* da Bruker.



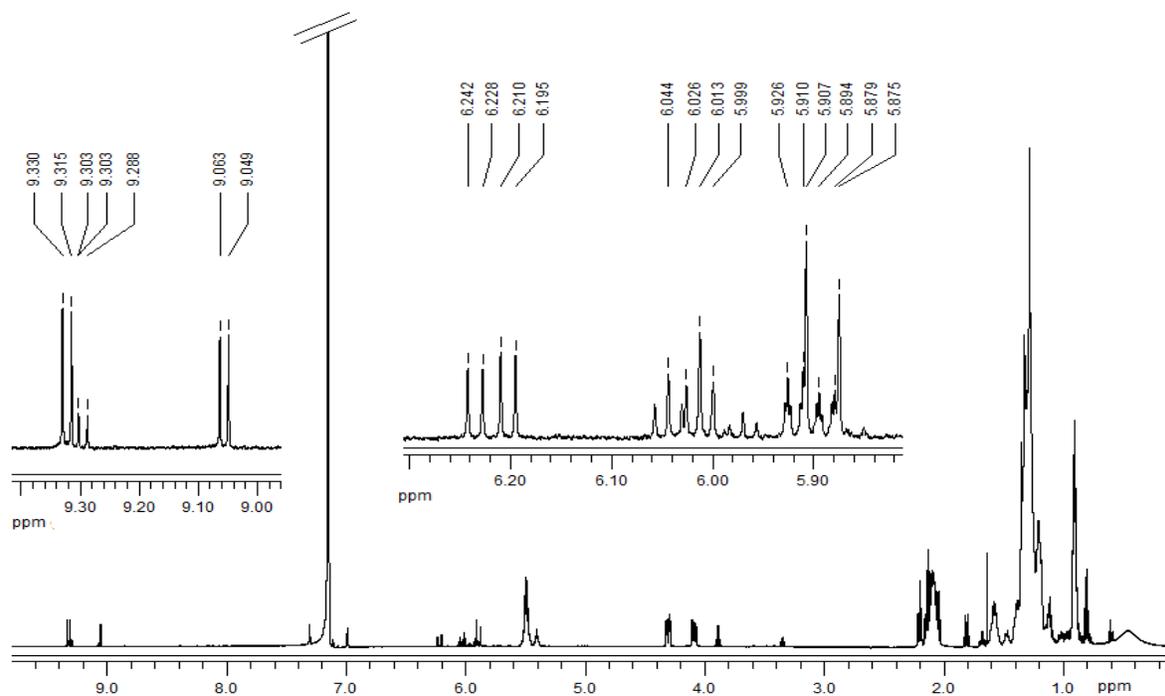
Anexo 104. Mapa de contorno de RMN de 2D ^1H - ^1H - COSY(400,18 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula fêmea de *Phloea subquadrata*. Espectro processado no programa *TopSpin* da Bruker.



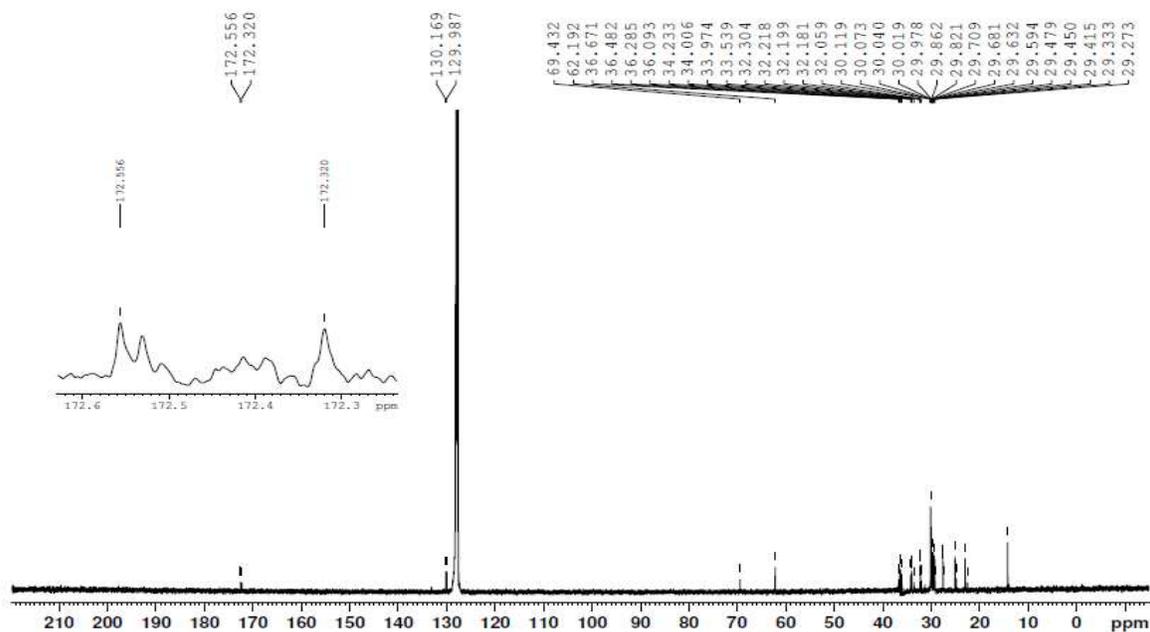
Anexo 105. Mapa de contorno de RMN de 2D ^1H - ^{13}C - HSQC(400,18 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula fêmea de *Phloea subquadrata*. Espectro processado no programa *TopSpin* da Bruker.



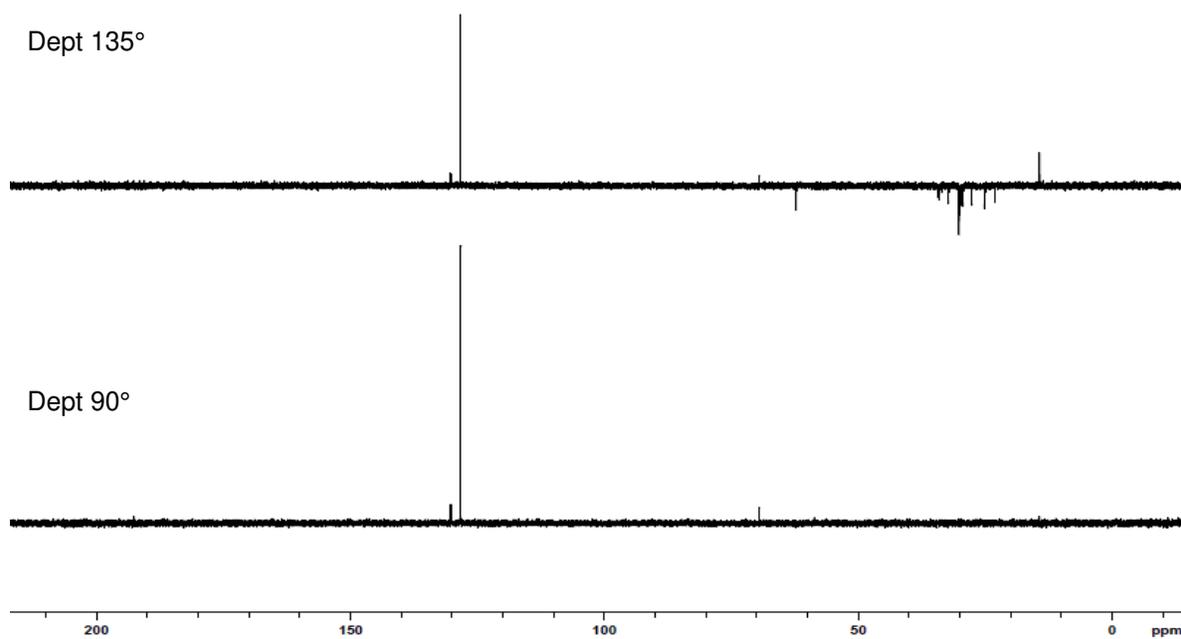
Anexo 106. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da secreção de glândula ninfa de 4º instar *Phloea subquadrata*. Espectro processado no programa *TopSpin* da Bruker.



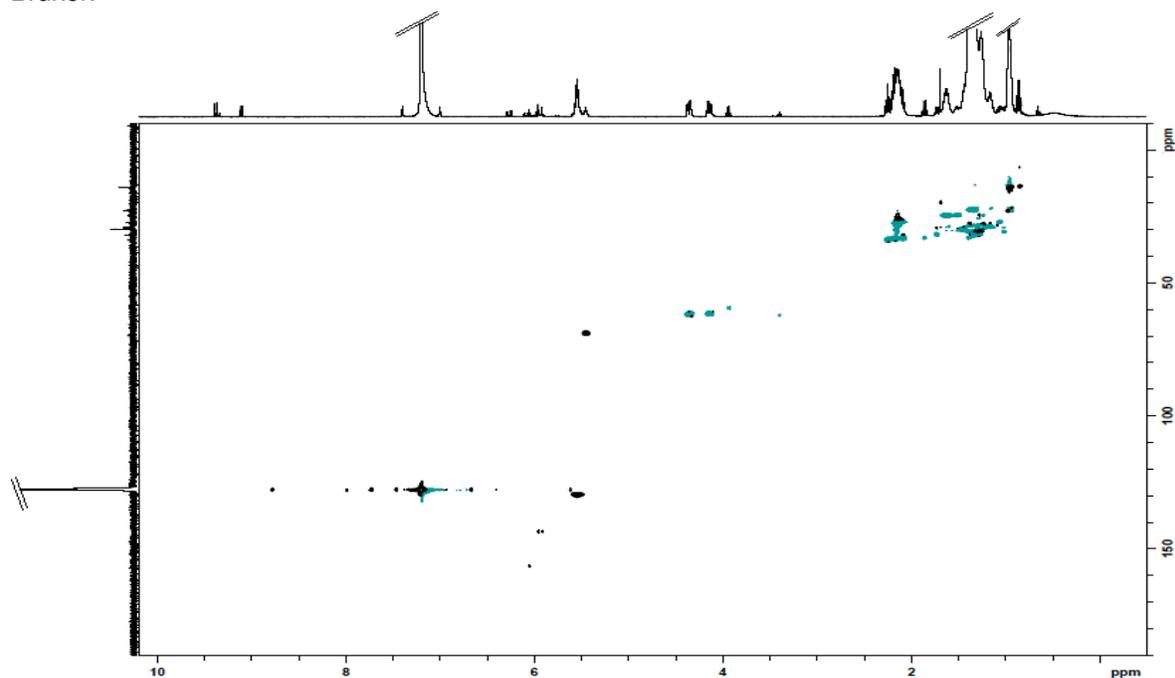
Anexo 107. Espectro de RMN de ^1H (400,18 MHz, C_6D_6) do extrato total de ninfas 4 $^\circ$ instar de *Phloeophana longirostris*. Processamento realizado no programa *MestRec*.



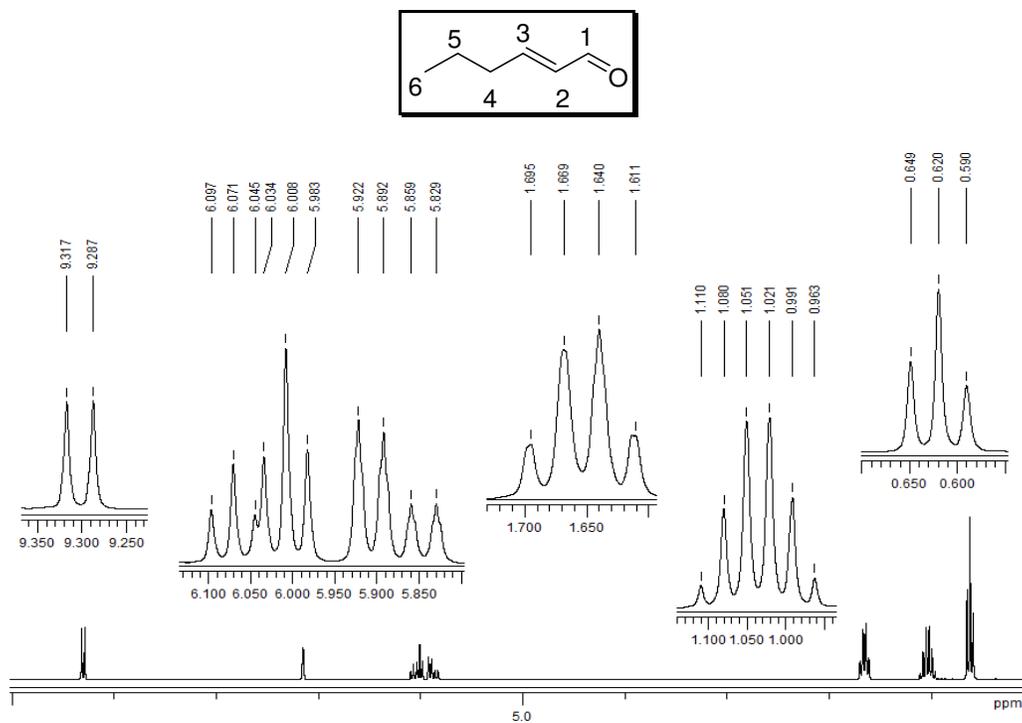
Anexo 108. Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, C_6D_6) do extrato total de ninfas 4 $^\circ$ instar de *Phloeophana longirostris*. Espectro processado no programa *TopSpin* da Bruker.



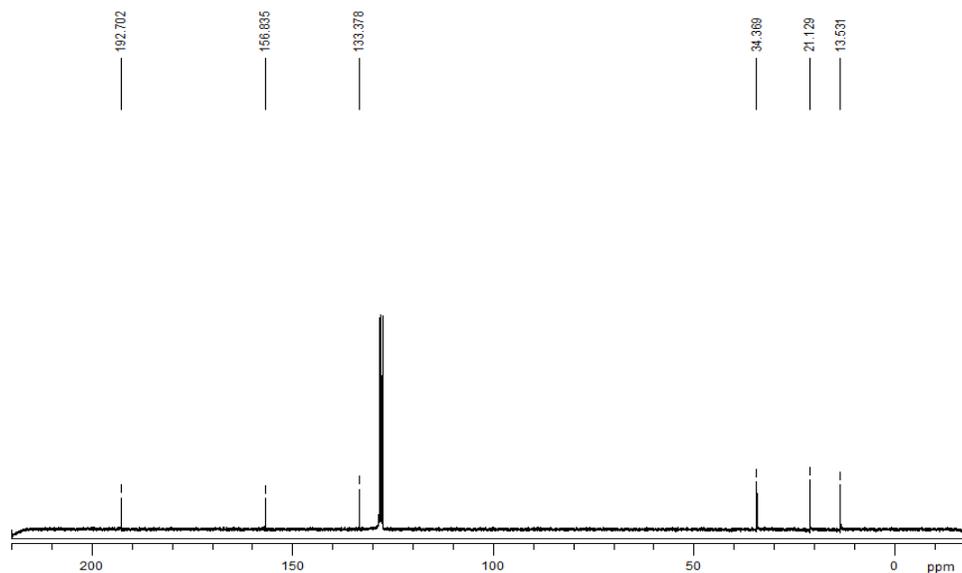
Anexo 109. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90. (100,63 MHz, C_6D_6) do extrato total de ninfas de 4° instar de *Phloeophana longirostris*. Espectro processado no programa *TopSpin* da Bruker.



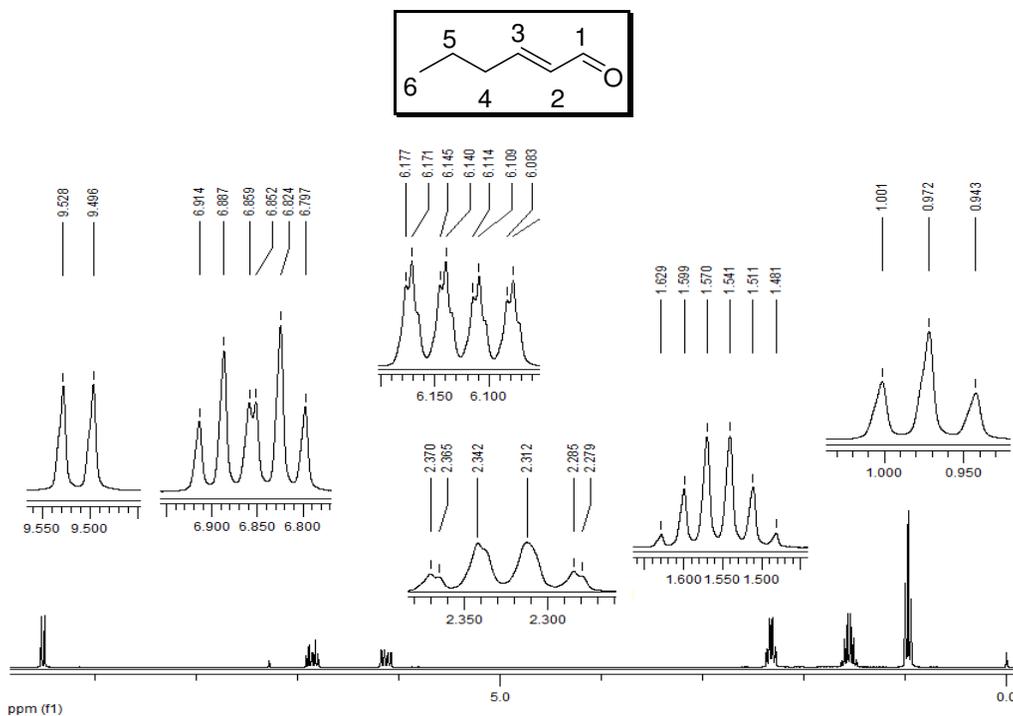
Anexo 110. Mapa de contorno de RMN de 2D ^1H - ^{13}C - HSQC(400,18 MHz, C_6D_6) do extrato total de ninfas de 4° instar de *Phloeophana longirostris*. Espectro processado no programa *TopSpin* da Bruker.



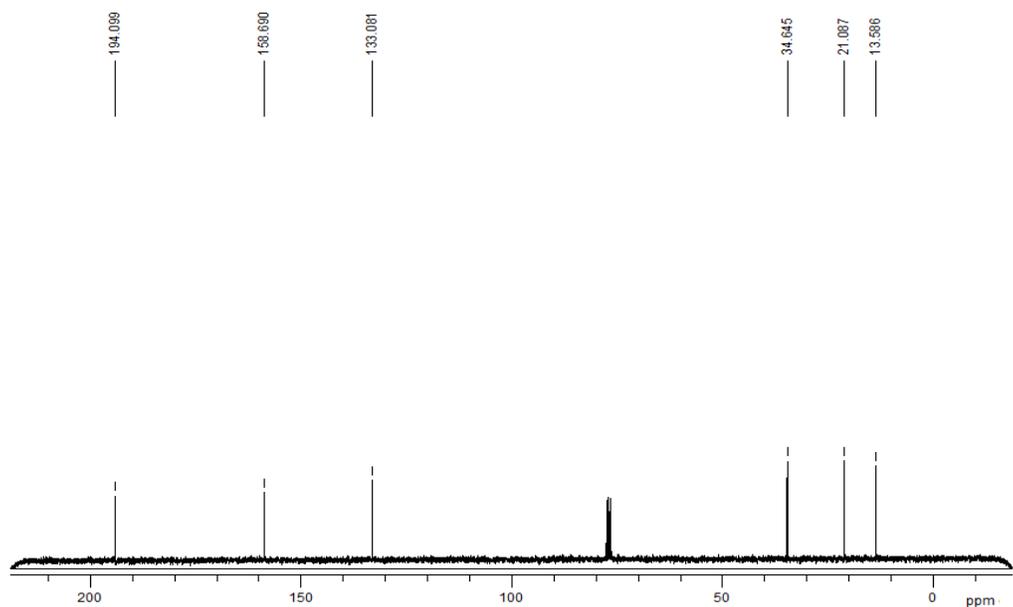
Anexo 111. Espectro de RMN de ¹H (250,13 MHz, C₆D₆) do padrão sintético (*E*)-2-hexenal (10). Processamento realizado no programa *MestRec*.



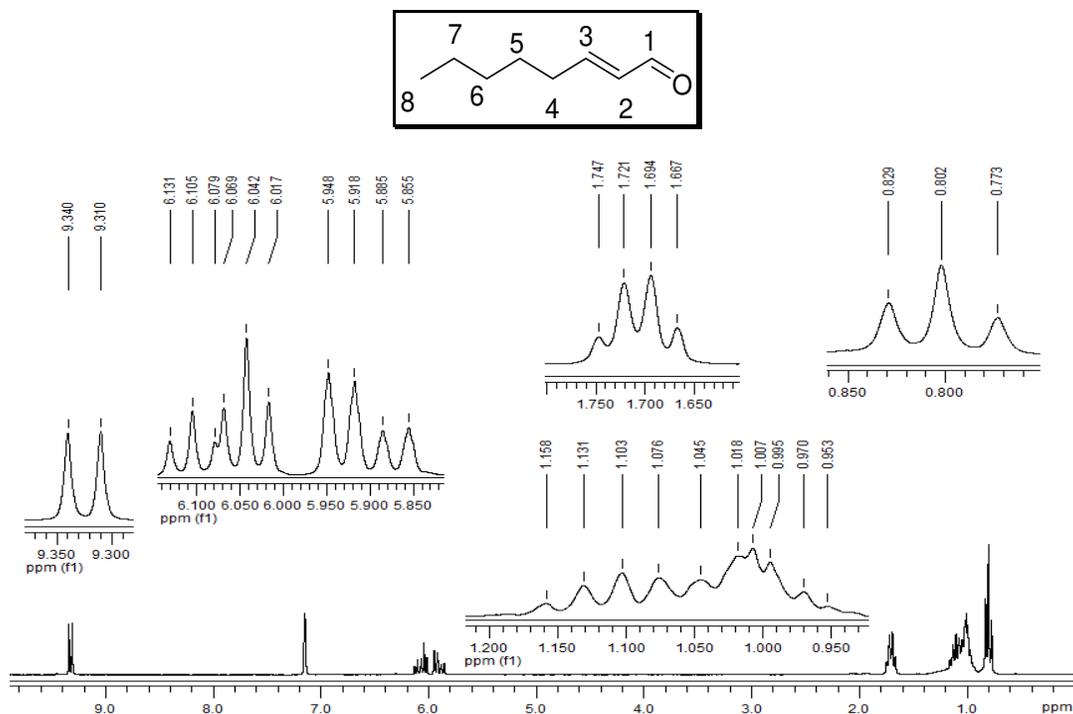
Anexo 112. Espectro de RMN de ¹³C (62,90 MHz, C₆D₆) do padrão sintético de (*E*)-2-hexenal (10). Processamento realizado no programa *MestRec*.



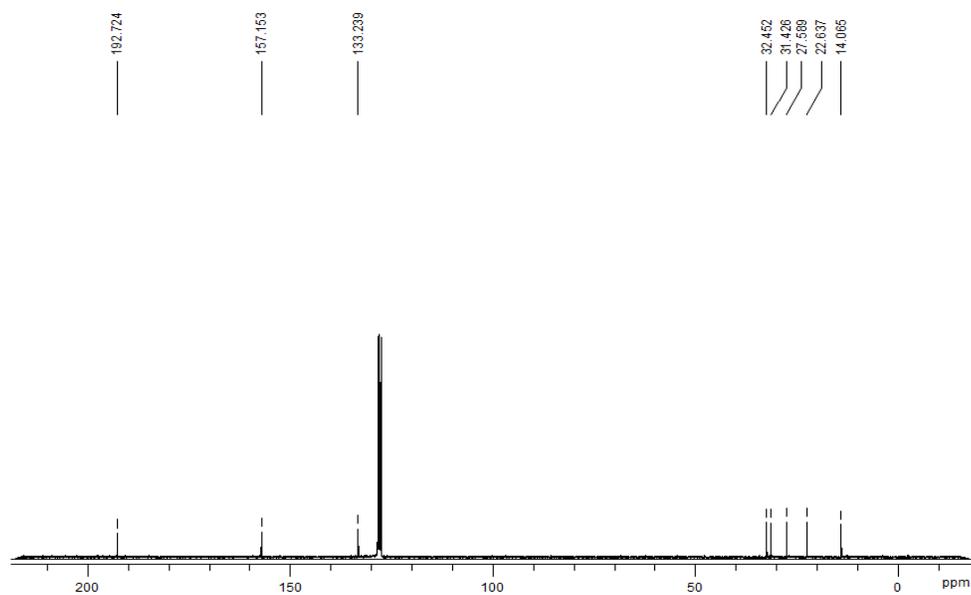
Anexo 113. Espectro de RMN de ¹H (250,13 MHz, CDCl₃) do padrão sintético (*E*)-2-hexenal (10). Processamento realizado no programa *MestRec*.



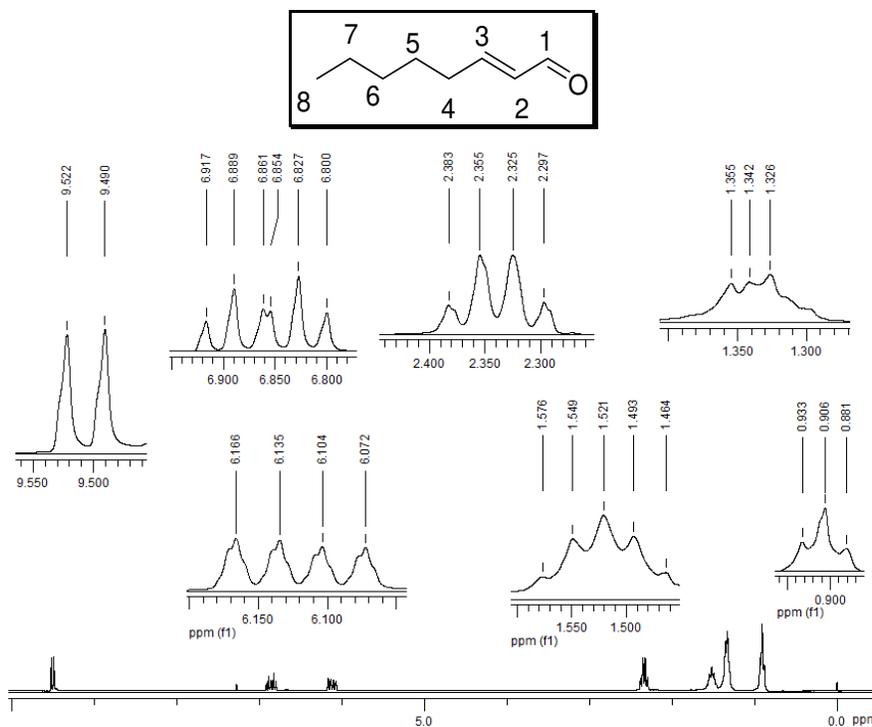
Anexo 114. Espectro de RMN de ¹³C (62,90 MHz, CDCl₃) do padrão sintético do (*E*)-2-hexenal (10). Processamento realizado no programa *MestRec*.



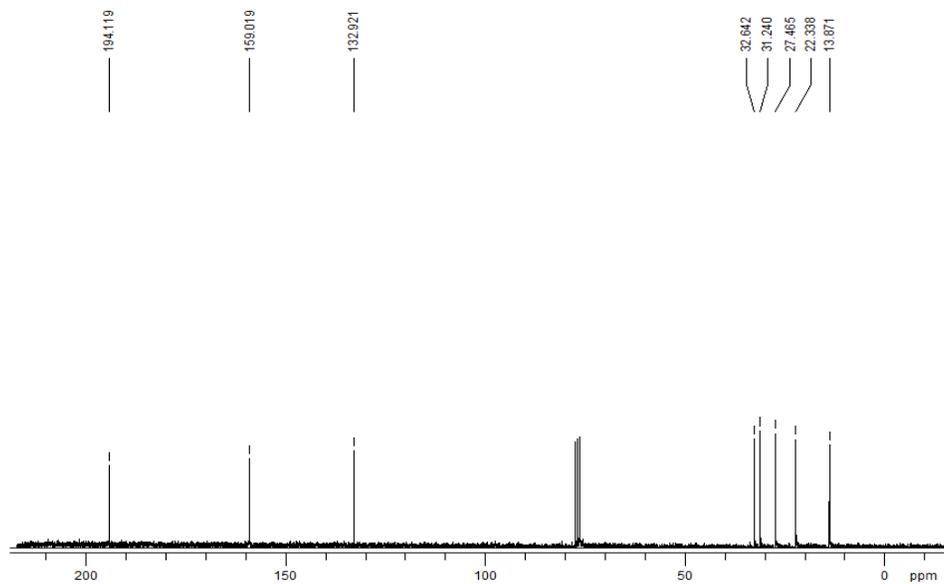
Anexo 115. Espectro de RMN de ^1H (250,13 MHz; C_6D_6) do padrão sintético de (*E*)-2-octenal (**32**). Processamento realizado no programa *MestRec*.



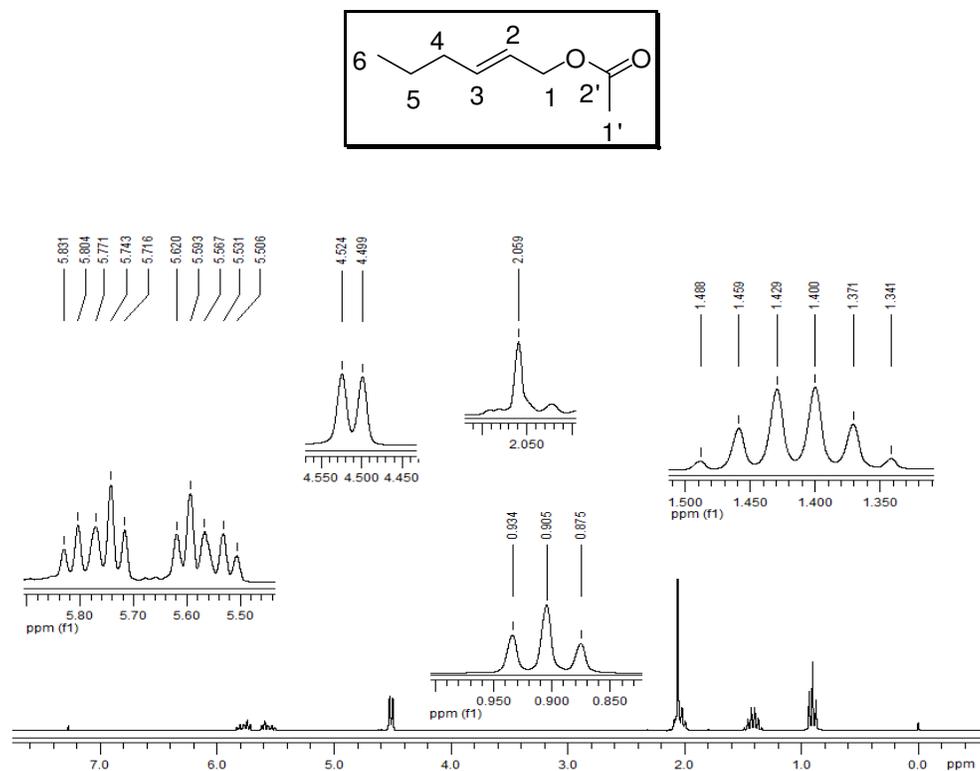
Anexo 116. Espectro de RMN de ^{13}C (62,90 MHz, C_6D_6) do padrão sintético de (*E*)-2-octenal (**32**). Processamento realizado no programa *MestRec*.



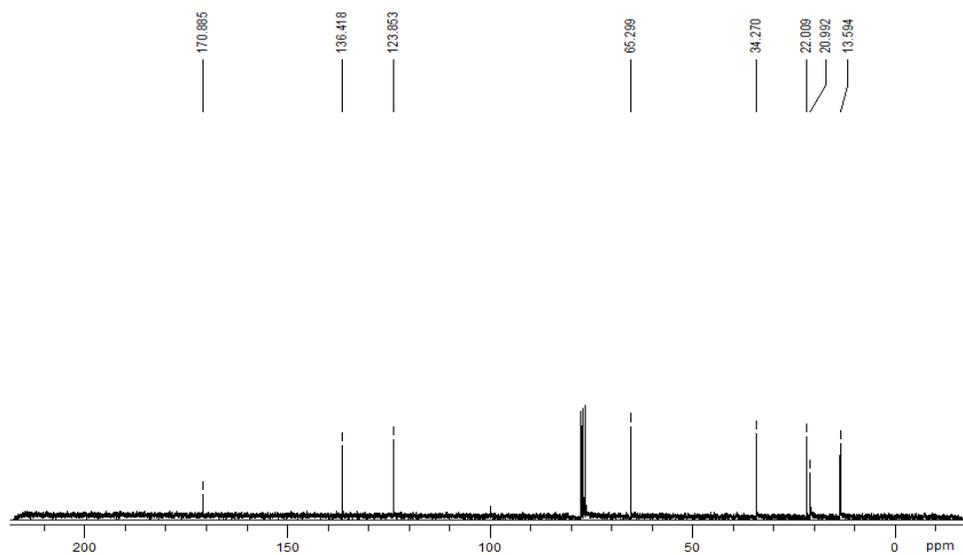
Anexo 117. Espectro de RMN de ^1H (250,13 MHz, CDCl_3) do padrão sintético de (*E*) 2-octenal (**32**). Processamento realizado no programa *MestRec*.



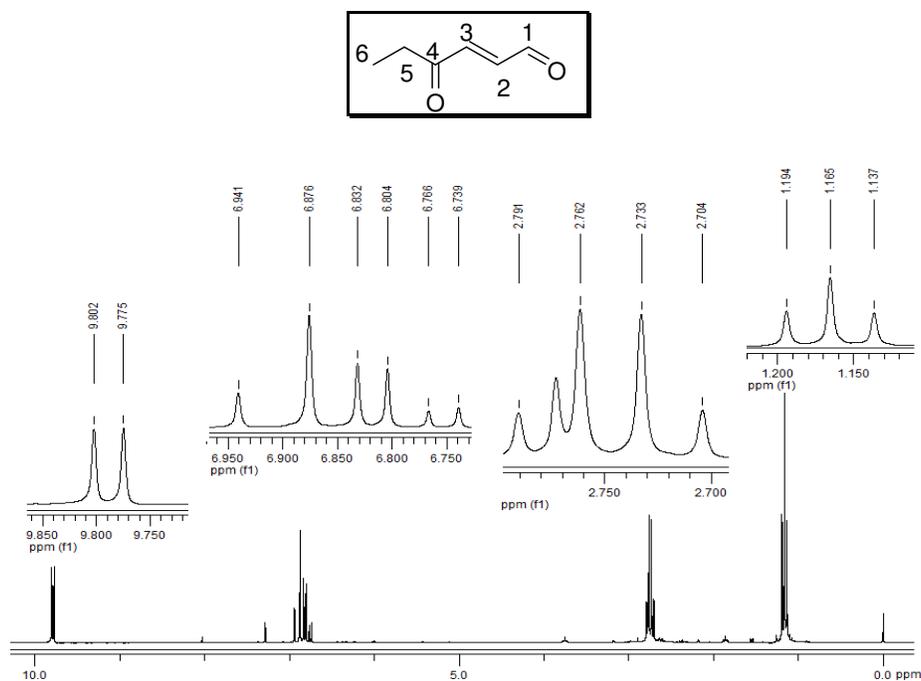
Anexo 118. Espectro de RMN de ^{13}C (62,90 MHz, CDCl_3) do padrão sintético de (*E*)-2-octenal (**32**). Processamento realizado no programa *MestRec*.



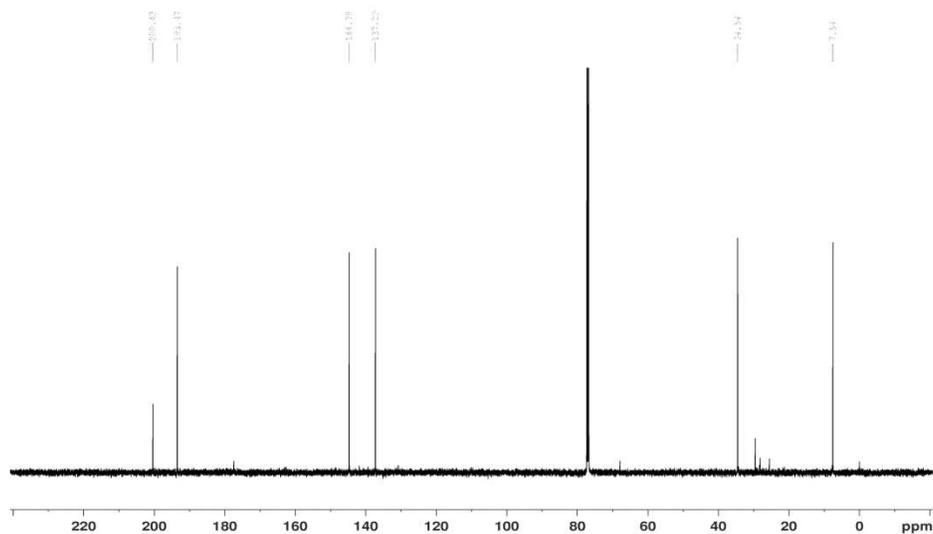
Anexo 119. Espectro de RMN de ^1H (250,13 MHz, CDCl_3) do padrão sintético do acetato de (*E*)-2-hexenila (**28**). Processamento realizado no programa *MestRec*.



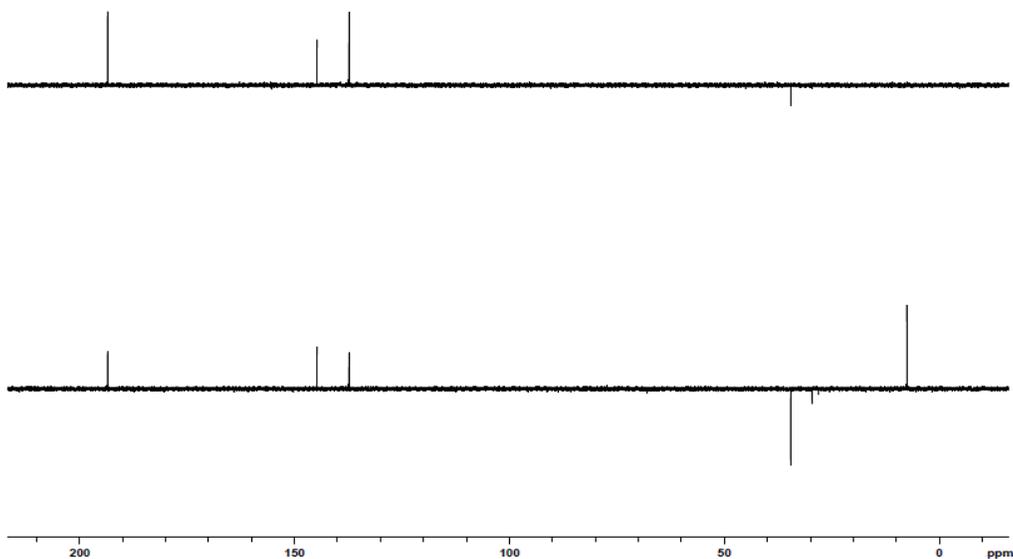
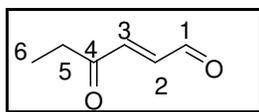
Anexo 120. Espectro de RMN de ^{13}C (62,90 MHz, CDCl_3) do padrão sintético do acetato de (*E*)-2-hexenila (**28**). Processamento realizado no programa *MestRec*.



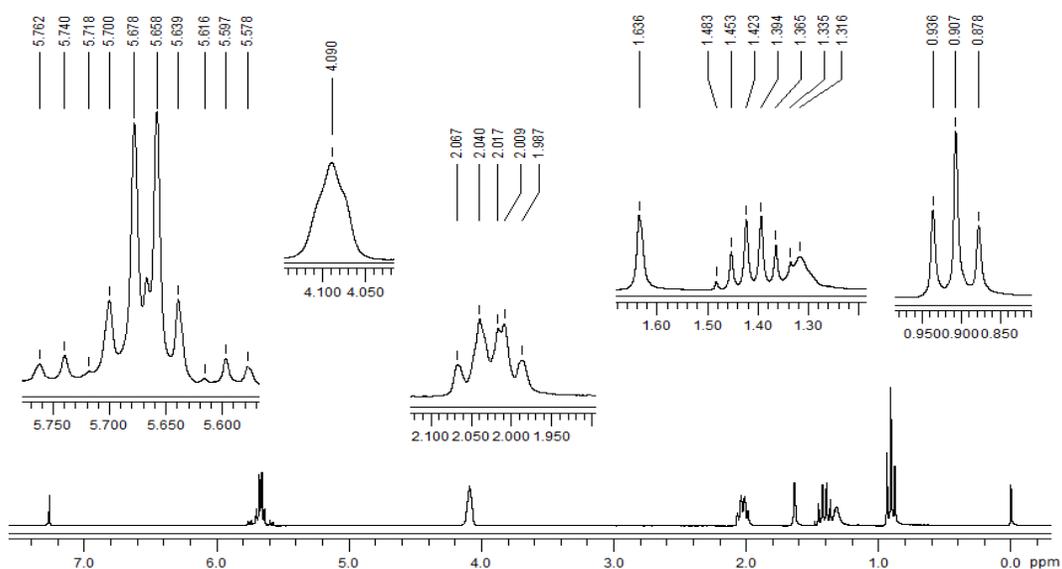
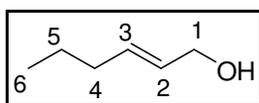
Anexo 121. Espectro de RMN ^1H (250,13 MHz; CDCl_3) do padrão sintético do (*E*)-4-oxo-2-hexenal (19). Processamento realizado no programa *MestRec*.



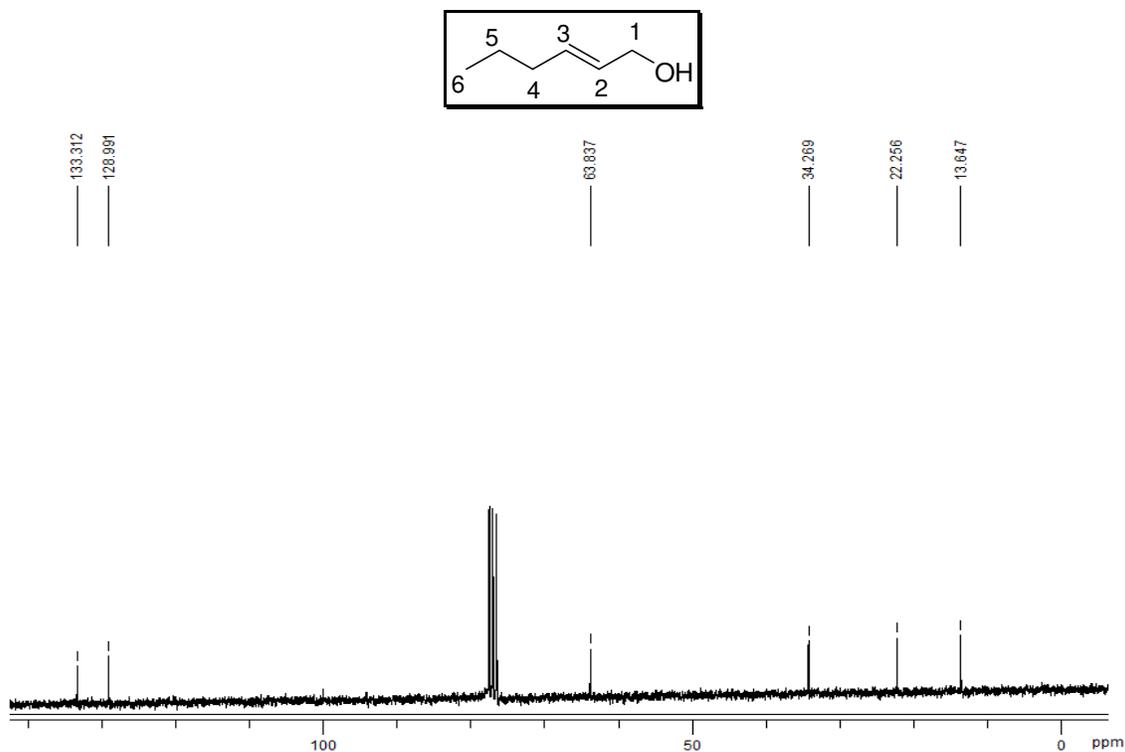
Anexo 122. Espectro de RMN de ^{13}C (62,90 MHz, CDCl_3) do padrão sintético do (*E*) 4-oxo- 2-hexenal (19). Espectro processado no programa *TopSpin* da Bruker.



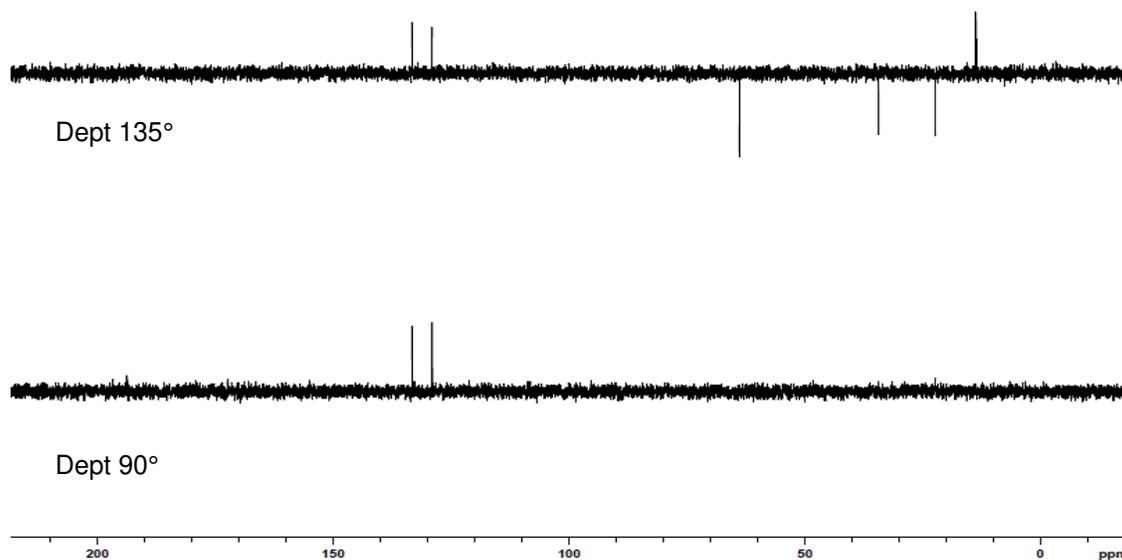
Anexo 123. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (62,90 MHz, CDCl_3) do padrão sintético do (*E*)-4-oxo- 2-hexenal (**19**). Espectro processado no programa *TopSpin* da Bruker.



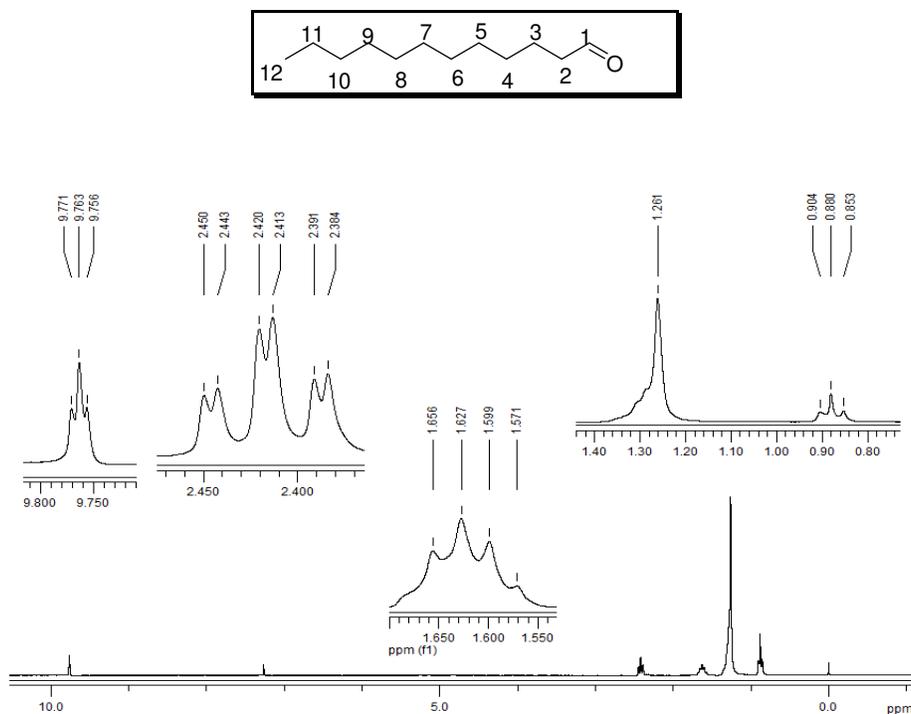
Anexo 124. Espectro de RMN de ^1H (250,13MHz, CDCl_3) do padrão sintético do (*E*)-2-hexenol (**12**). Processamento realizado no programa *MestRec*.



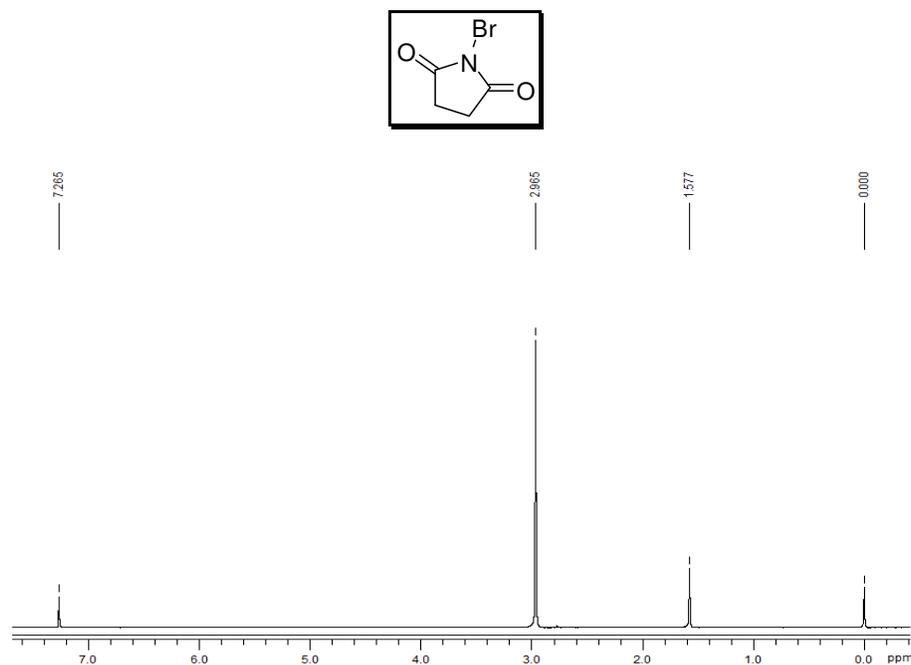
Anexo 125. Espectro de RMN de ^{13}C (62,90 MHz, CDCl_3) do padrão sintético do (*E*)-2-hexenol (12). Processamento realizado no programa *MestRec*.



Anexo 126. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (62,90 MHz, CDCl_3) do padrão sintético do (*E*)-2-hexenol (12). Espectro processado no programa *TopSpin* da Bruker.



Anexo 127. Espectro de RMN de ^1H (250 MHz; CDCl_3) do padrão sintético dodecanal. Processamento realizado no programa *MestRec*.

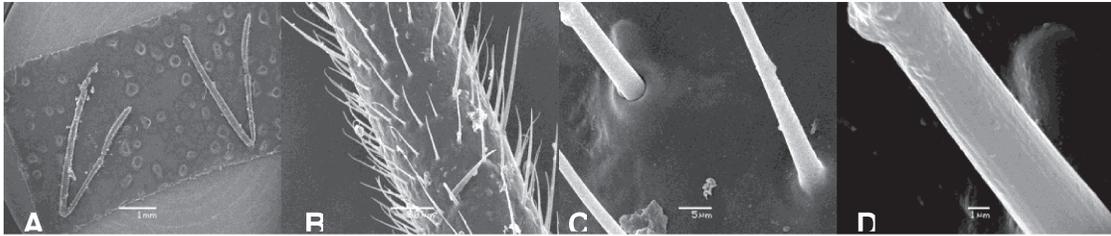


Anexo 128. Espectro de RMN de ^1H (250 MHz; CDCl_3) do N-bromosuccinimida recristalizado. Processamento realizado no programa *MestRec*.

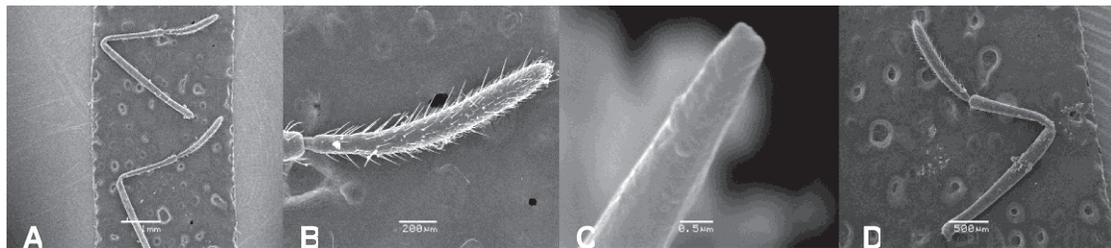
Anexo 129. Compostos detectados nas glândulas através da análise por CG-EM

N°	compostos	<i>Phloea subquadrata</i>			<i>Phloeophana longirostris</i>		
		fêmeas	machos	Ninfas	fêmeas	machos	ninfas
10	(<i>E</i>)-2-hexenal	17,0 ± 11,7	11,7 ± 16,3	4,6 ± 1,7	56,8 ± 18,8	22,4 ± 25,8	1,6 ± 1,0
19	(<i>E</i>)-4-oxo-2-hexenal	-	-	39,6 ± 9,9	-	-	15,4 ± 15,1
22	5-etil-2(3H)-furanona	-	32,4 ± 4,2	-	-	-	-
24	decano	14,6 ± 6,9	2,3 ± 0,5	-	-	-	-
28	acetato de (<i>E</i>)-2-hexenila	10,1 ± 7,0	6,3 ± 1,6	-	-	6,7 ± 1,7	-
32	(<i>E</i>)-2-octenal	-	-	20,8 ± 4,9	5,2 ± 4,8	-	15,2 ± 4,7
113	ácido (<i>E</i>)-2-hexenóico	-	-	-	11,3 ± 16,0	-	-
37	undecano	33,9 ± 0,5	28,4 ± 8,1	29,0 ± 11,4	38,7 ± 26,5	55,1 ± 37,4	26,2 ± 8,3
50	tridecano	4,4 ± 0,9	3,0 ± 0,8	-	-	1,6 ± 0,4	1,2 ± 0,4
95	α-selineno	-	-	-	2,4 ± 0,8	1,0 ± 0,0	-
114	óxido de cariofileno	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	-	-	-	-

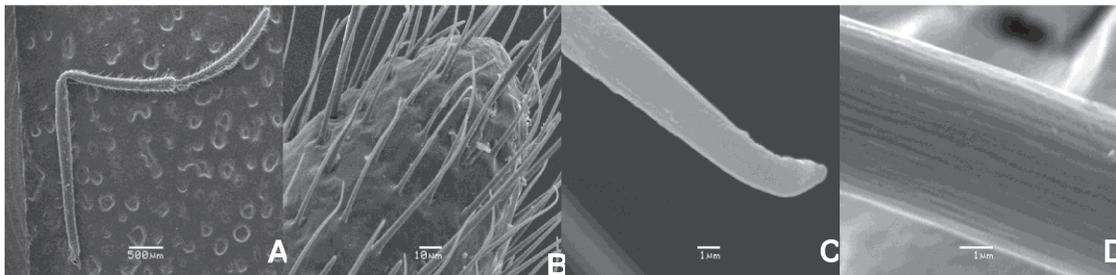
Tabela construída com 8 indivíduos de *Phloea subquadrata* (fêmeas: 2; machos: 2; ninfas: 4 (4° e 5° instares) e 10 indivíduos de *Phloeophana longirostris* (fêmeas: 3; machos: 2; ninfas: 5 (4° e 5° instar). Valores referente a abundância relativos dos compostos detectados com área do pico cromatográfico maiores que 1%. (-) refere-se aos compostos não detectados, ou que estavam presentes, porém com abundância relativa inferior a 1% da área total dos picos no cromatogramas.



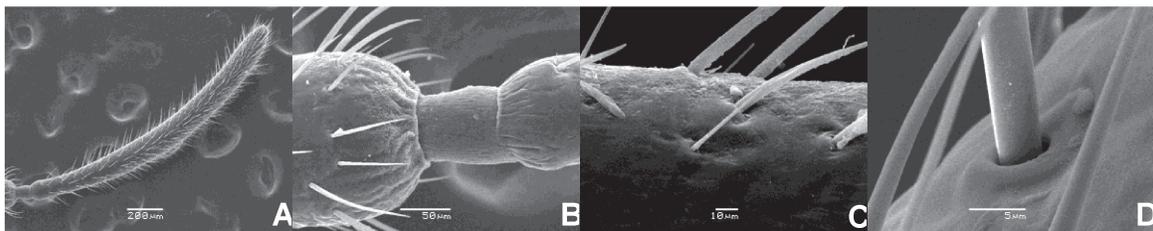
Anexo 130. Microscopia eletrônica de varredura da antena de fêmea de percevejo da espécie *Phloea subquadrata* A: Par de antenas apresentando os três segmentos: escapo, pedicelo e o flagelo. B: Ampliação da região do flagelo da antena com incrustações nas sensilas. C: Base de fixação das sensilas no flagelo. D: Microporos presentes na sensila.



Anexo 131. Microscopia eletrônica de varredura da antena de percevejos da espécie *Phloea subquadrata* A: Par de antenas de macho apresentando os três segmentos: escapo, pedicelo e o flagelo. B: Ampliação da região do flagelo da antena de macho com incrustações. C: Ápice de uma sensila de macho. D: Antena de um indivíduo jovens 5º ínstar da espécie *Phloea subquadrata* apresentando os três segmentos.



Anexo 132. Microscopia eletrônica de varredura da antena de macho de *Phloeophana longirostris*. A: Antena completa mostrando os três segmentos: escapo, pedicelo e o flagelo. B: Ampliação da região do flagelo da antena. C e D: Microporos presentes na sensila da região flagelar.



Anexo 133. Microscopia eletrônica de varredura da antena de fêmea de *Phloeophana longirostris*. A: Flagelo e ligação com o pedicelo. B: Ampliação da região de ligação do flagelo com o pedicelo. C: Região do flagelo com as diferentes formas de sensilas e D: Base de uma sensila ligada ao flagelo.



Anexo 134. Ovos de *Phloeophana longirostris* após armazenagem a -20 °C.



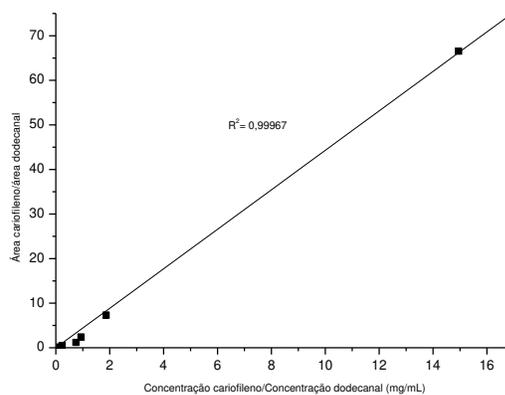
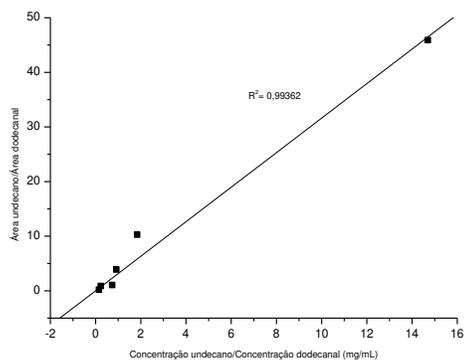
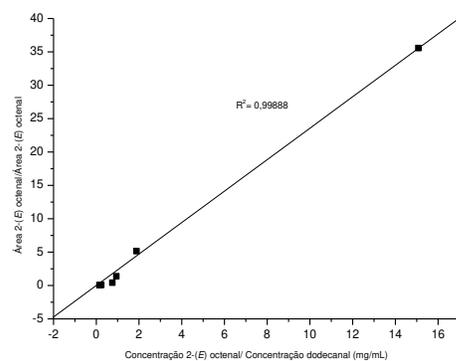
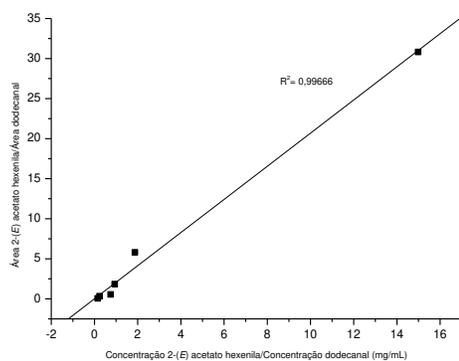
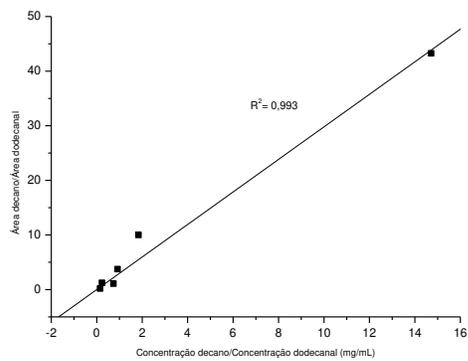
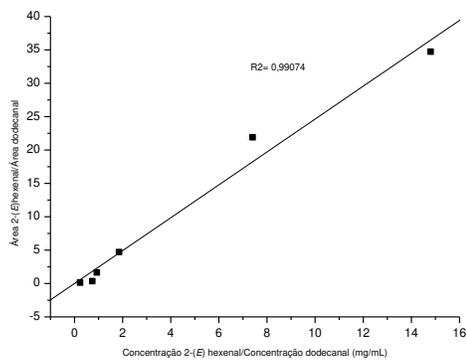
Anexo 135. Ninfas de 1° ínstar de *Phloeophana longirostris*. **A:** ninfas eclodidas dos ovos armazenados 2 a 8 °C. **B:** região ventral com detalhe das antenas. **C:** região ventral e dorsal das ninfas.

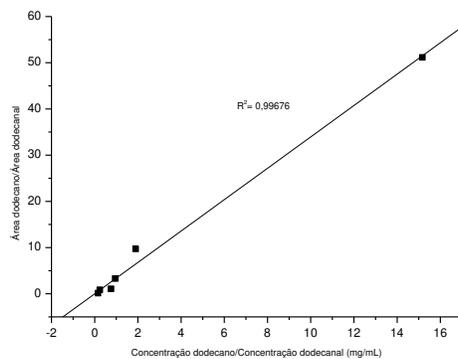


Anexo 136. Ninfas de 2° ínstar de *Phloeophana longirostris*. **A:** região ventral e cabeça. **B:** detalhe do par de antenas com três segmentos. **C:** região dorsal, mostrando parte do aparelho bucal.



Anexo 137. Ninfas de 3° ínstar *Phloeophana longirostris*. **A:** detalhe dos olhos na região dorsal. **B:** imagem da região do dorso da ninfa com iluminação comum. **C:** imagem do dorso da ninfa com luz polarizada.

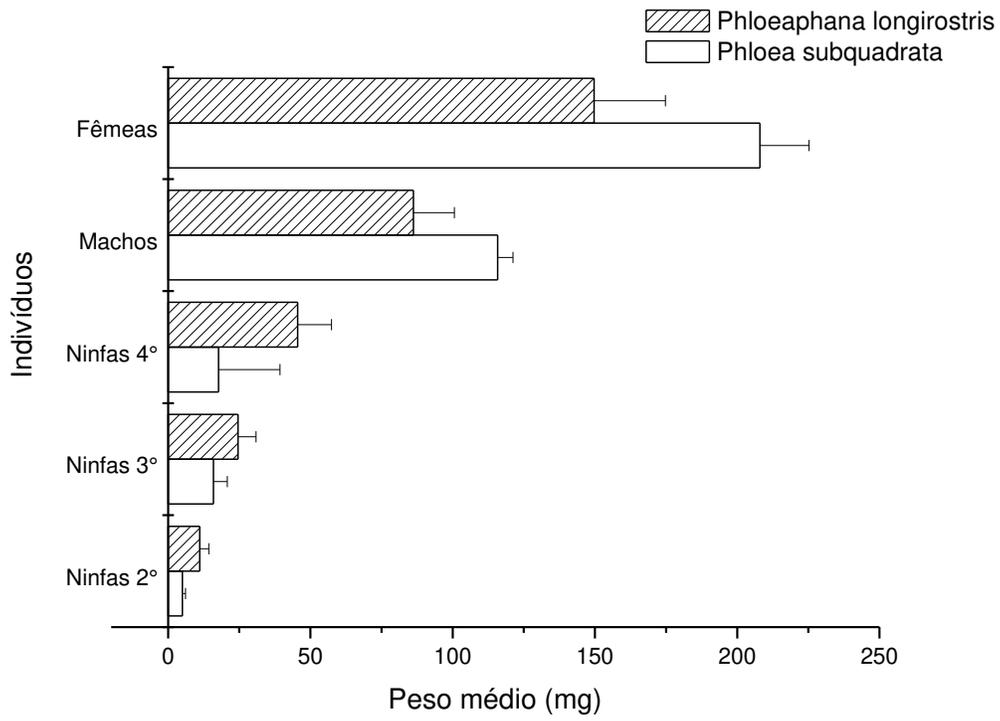




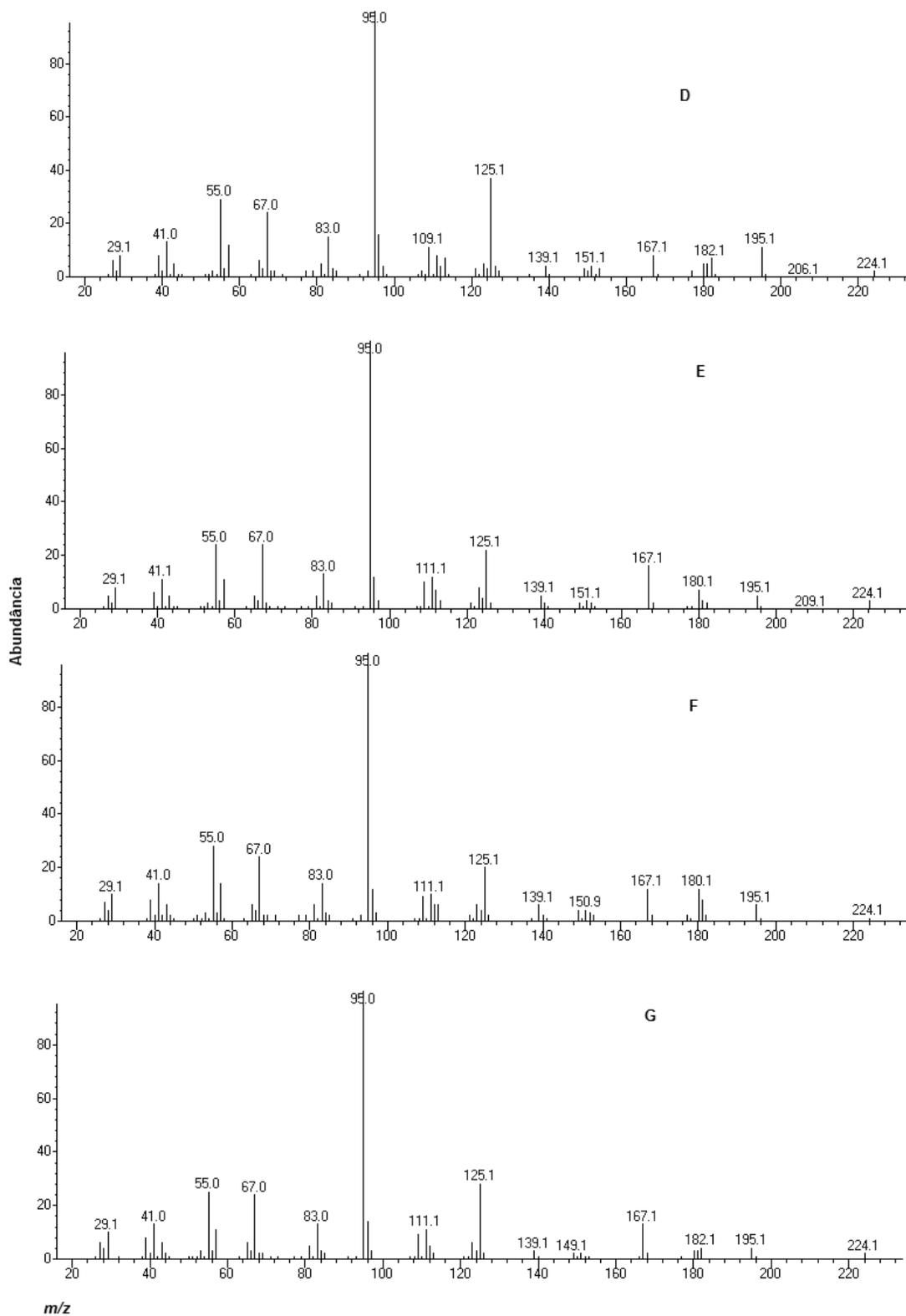
Anexo 138. Curva de calibração dos compostos presentes nos indivíduos *Phloea subquadrata*.

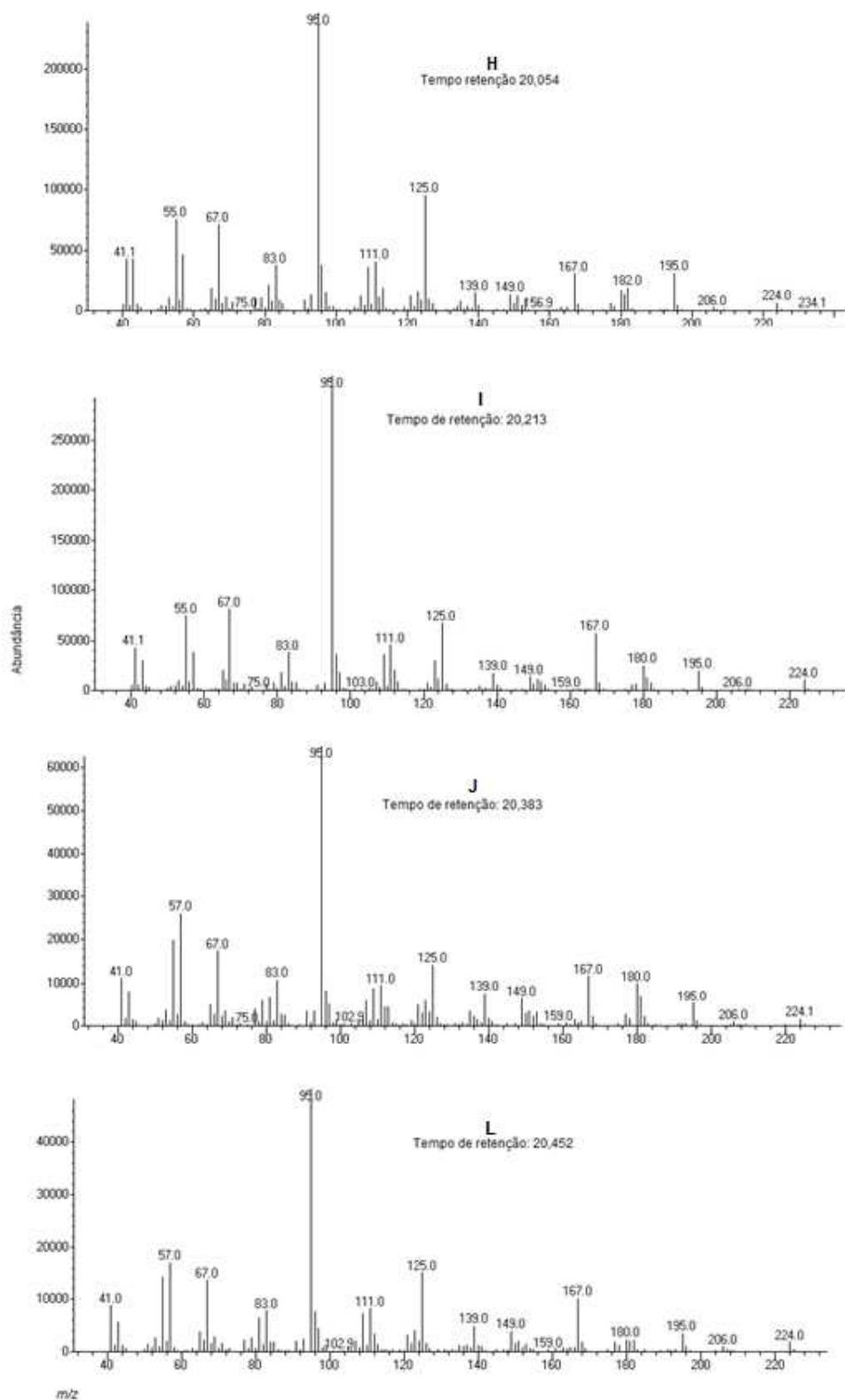
Anexo 139. Peso médio dos indivíduos de *Phloea subquadrata* e *Phloeophana longirostris*

Indivíduos	Peso médio (mg)			
	<i>Phloeophana longirostris</i>		<i>Phloea subquadrata</i>	
Ninfa 2°	11,1	± 3,2	5,3	± 1,1
Ninfa 3°	24,6	± 6,3	10,4	± 4,9
Ninfa 4°	45,5	± 11,9	32,0	± 21,6
Macho	86,2	± 14,4	115,4	± 5,4
Fêmea	151,4	± 24,3	130,4	± 17,2

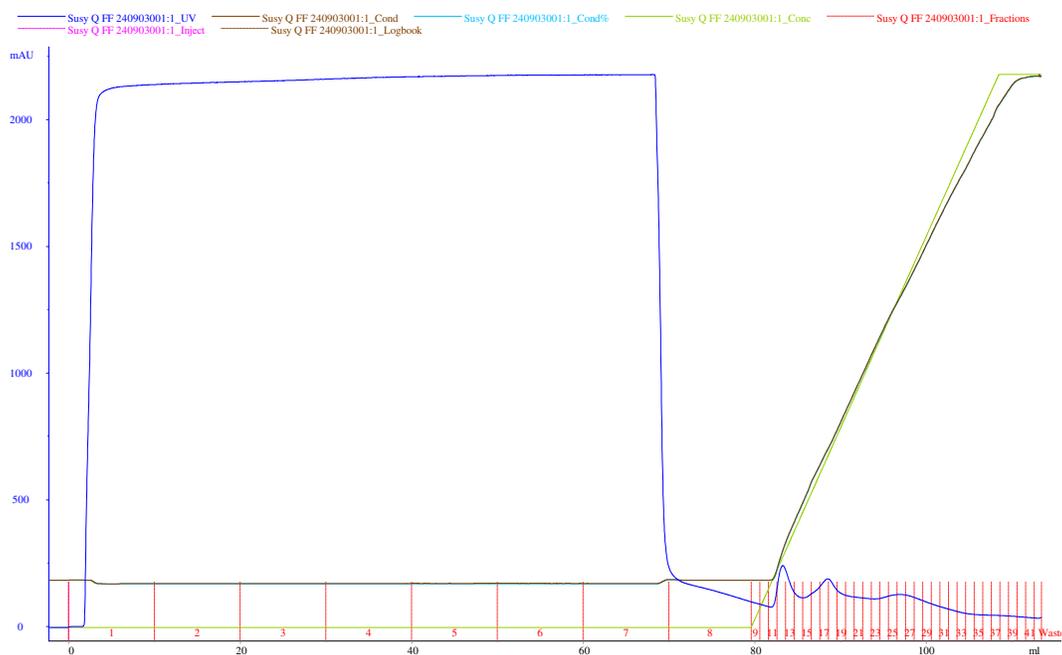


Anexo 140. Relação entre o peso médio dos indivíduos de *Phloea subquadrata* e *Phloeophana longirostris* submetidos a análises.

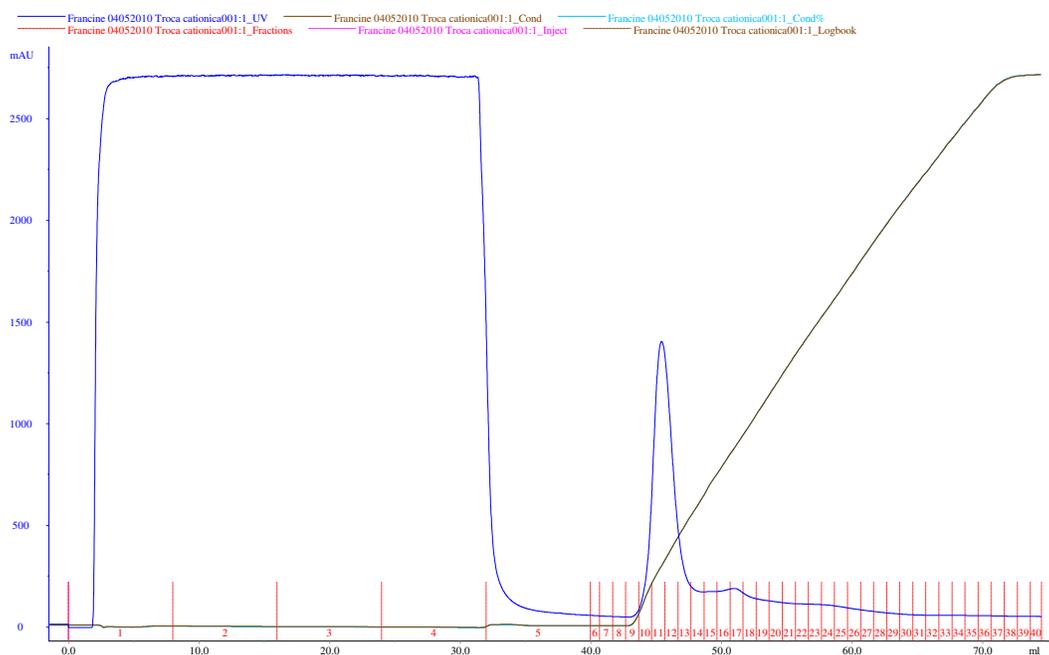
**Anexo 141.** Espectro de massas dos 4 dímeros sintéticos do m/z 112.



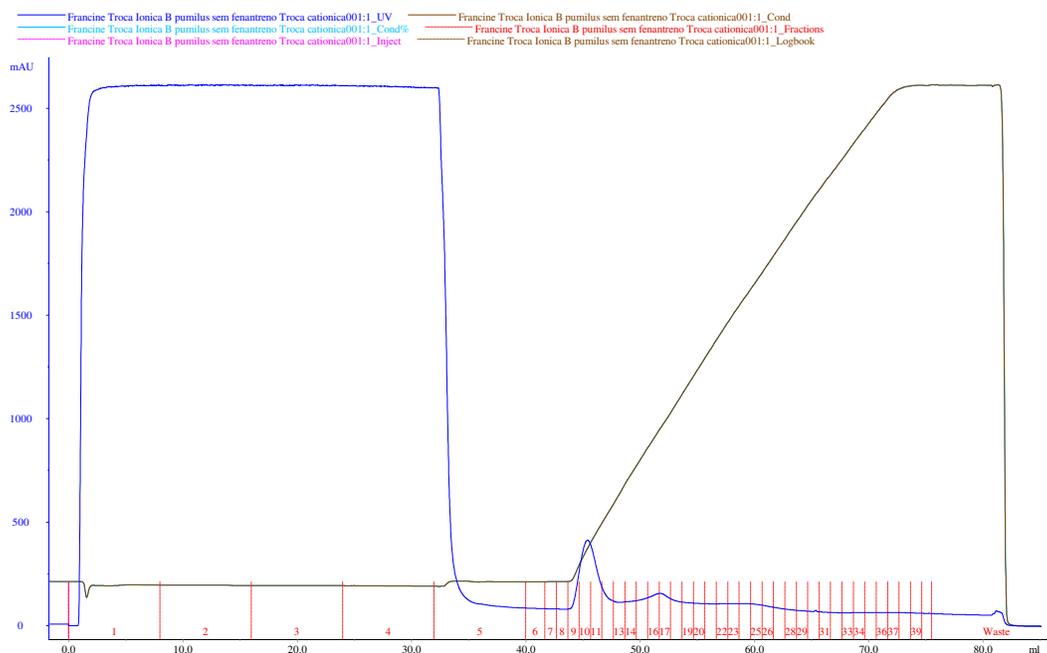
Anexo 142. Espectro de massas dos dímeros detectados na glândula de macho de *Phloea subquadrata*.



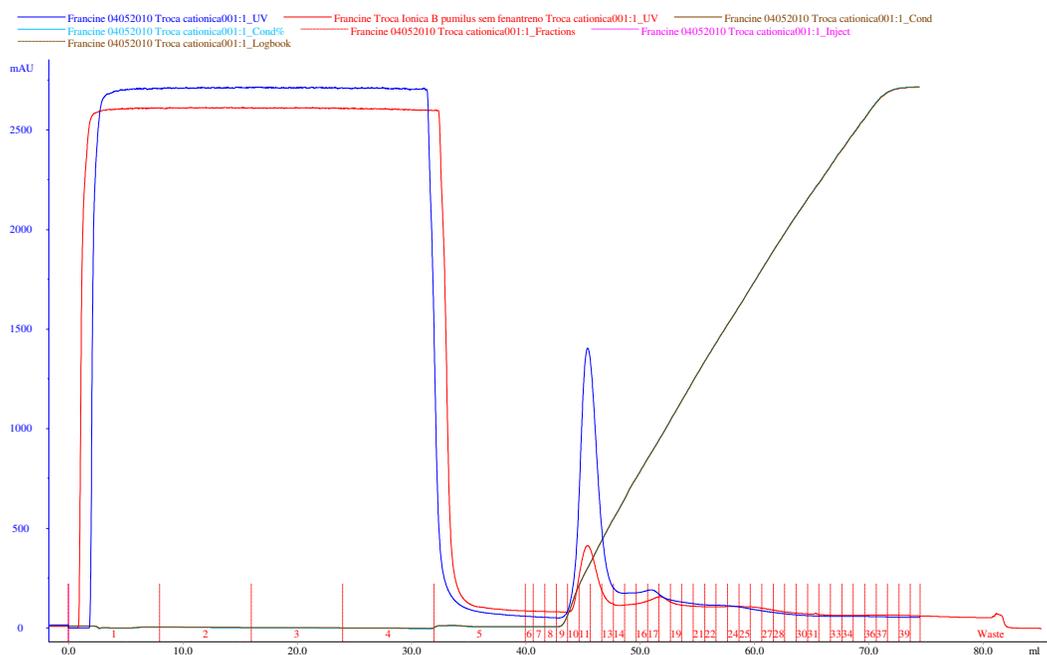
Anexo 143. Cromatograma troca catiônica referente a 1° do processo de purificação das proteínas do extrato solúvel de *Bacillus safensis* pH 7,6. Linha em azul refere-se ao gradiente de absorvância.



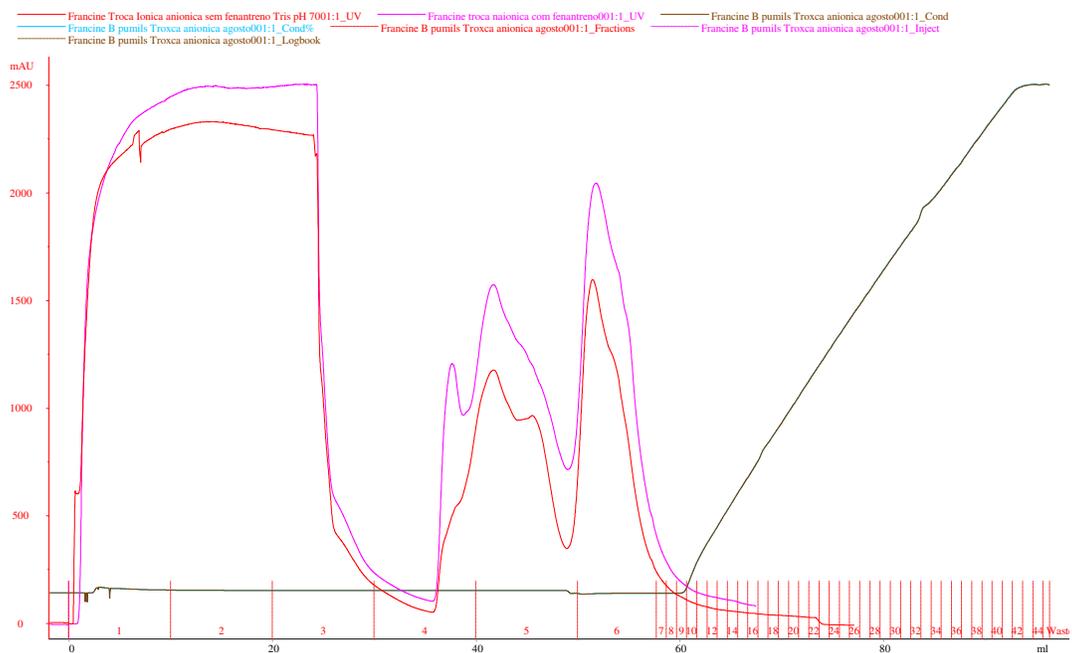
Anexo 144. Cromatograma da troca catiônica referente a 2° do processo de purificação das proteínas do extrato solúvel de *Bacillus safensis* pH 7,6 (na presença do fenantreno). Linha em azul refere-se ao gradiente de absorvância.



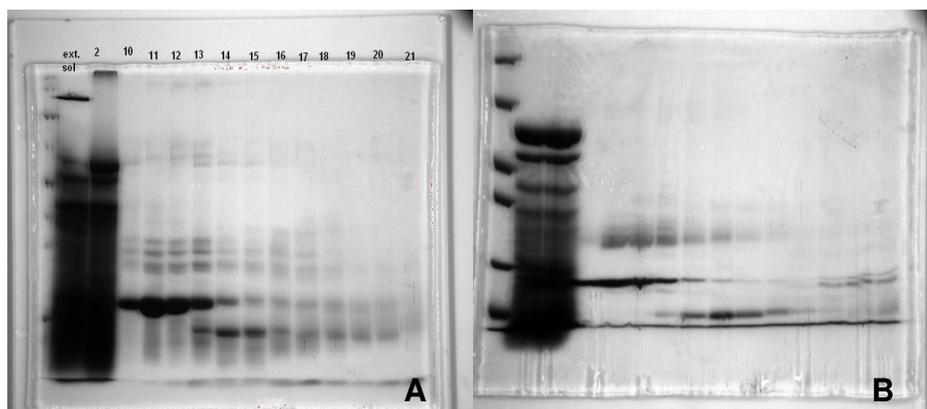
Anexo 145. Cromatograma da troca catiônica referente ao 3º processo de purificação das proteínas do extrato solúvel de *Bacillus safensis* pH 7.6. Linha em azul refere-se ao gradiente de absorvância.



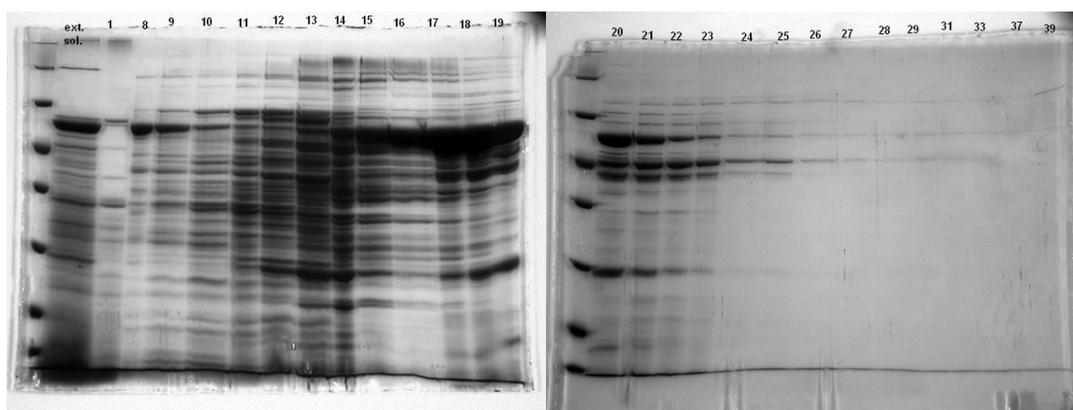
Anexo 146. Cromatogramas (FPLC-UV) referente à 1ª purificação (vermelho, sem fenantreno) e da 2ª purificação (azul, com fenantreno) da troca catiônica do *Bacillus safensis*.



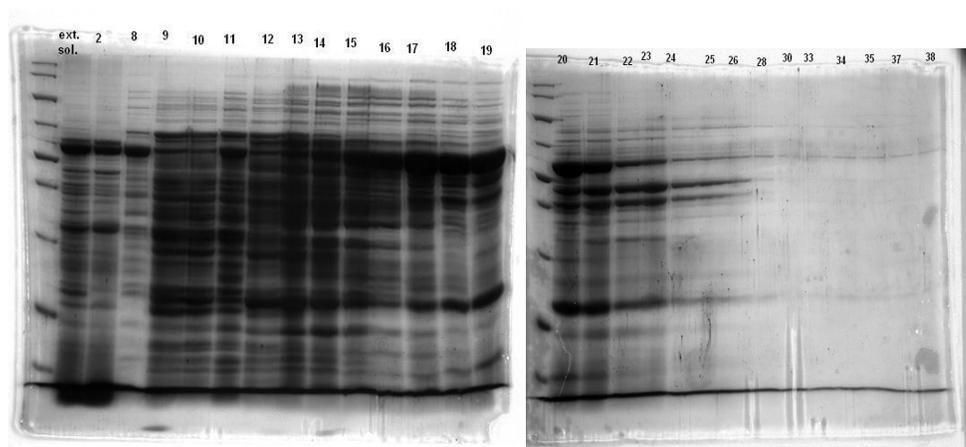
Anexo 147. Cromatogramas (FPLC-UV) referente à 1^o purificação (vermelho, sem fenantreno) e da 2^o purificação (rosa, com fenantreno) da troca aniônica do *Bacillus safensis*.



Anexo 148. Géis das frações da troca catiônica da segunda purificação de *Bacillus safensis*. A: com fenantreno. B: sem fenantreno



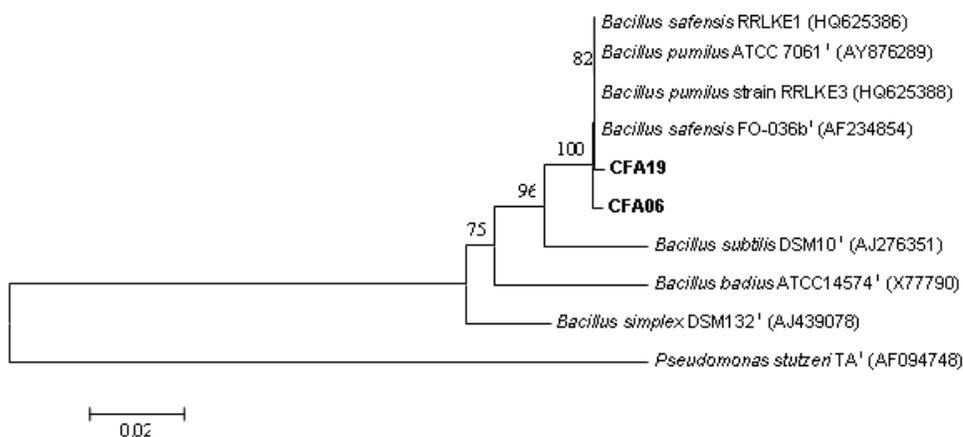
Anexo 149. Géis das frações da troca aniônica da segunda purificação, sem fenantreno em ambos, de *Bacillus safensis*.



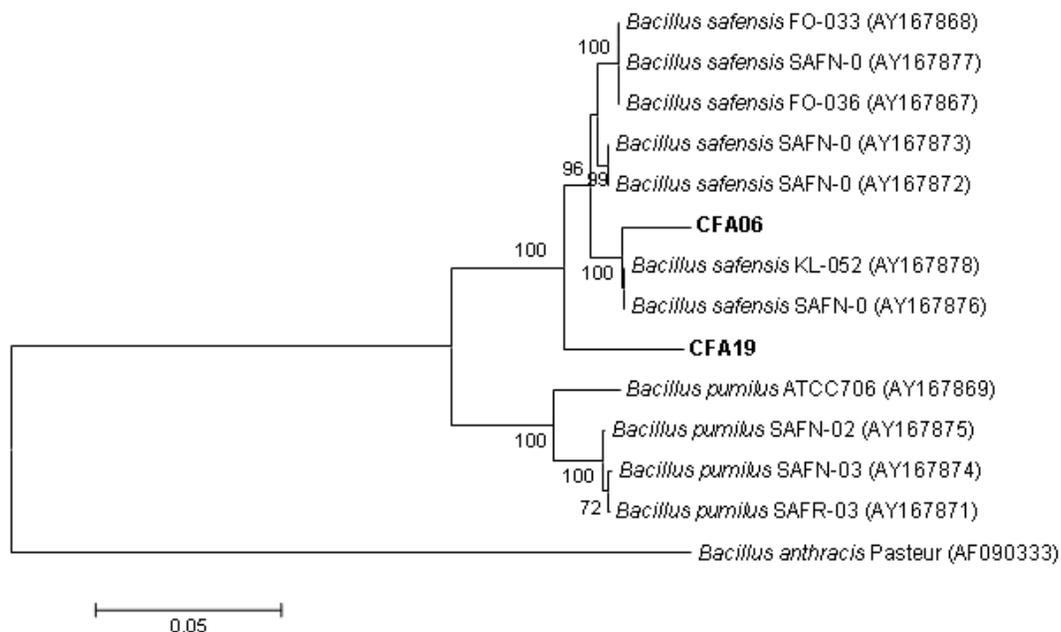
Anexo 150. Géis das frações da troca aniônica da segunda purificação, com fenantreno em ambos, de *Bacillus safensis*.

Anexo 151. Percentual de fluorescência da troca catiônica da 2ª purificação.

Catiônica COM fenantreno						Catiônica SEM fenantreno					
Fração	24hs	72hs	Fração	24hs	72hs	Fração	24hs	72hs	Fração	24hs	72hs
F1	3,22	0,00	F21	0,00	0,00	F1	6,04	6,30	F21	1,18	0,70
F2	1,29	5,52	F22	0,00	0,00	F2	3,98	3,98	F22	0,00	0,00
F3	11,00	21,88	F23	0,00	0,00	F3	3,91	5,07	F23	1,88	0,96
F4	0,00	4,68	F24	0,00	0,00	F4	2,88	2,82	F24	0,00	0,00
F5	0,00	5,92	F25	0,00	0,38	F5	3,51	3,72	F25	3,85	2,52
F6	0,69	4,21	F26	0,00	0,00	F6	2,24	2,39	F26	0,00	0,00
F7	0,40	2,79	F27	0,00	0,00	F7	3,49	3,87	F27	3,38	2,06
F8	0,60	2,24	F28	0,00	0,00	F8	2,85	3,59	F28	0,00	0,00
F9	0,350	1,18	F29	0,00	0,00	F9	5,22	5,73	F29	0,58	0,484
F10	6,89	10,98	F30	0,00	0,00	F10	4,74	5,01	F30	0,00	0,00
F11	12,95	17,52	F31	0,00	0,00	F11	6,36	6,69	F31	0,00	0,00
F12	15,35	20,44	F32	0,00	0,00	F12	4,21	5,84	F32	0,00	0,00
F13	9,91	13,07	F33	0,00	0,00	F13	5,17	5,38	F33	0,00	4,20
F14	12,44	15,56	F34	0,00	0,00	F14	7,56	7,53	F34	0,00	0,00
F15	10,34	11,69	F35	0,00	0,00	F15	8,25	7,99	F35	0,00	0,00
F16	0,00	1,26	F36	0,00	0,00	F16	0,00	0,00	F36	0,00	0,00
F17	0,00	9,14	F37	0,00	0,00	F17	1,47	5,04	F37	0,00	0,00
F18	0,00	0,00	F38	0,00	0,00	F18	0,00	0,00	F38	0,00	0,00
F19	0,00	0,00	F39	0,00	0,00	F19	6,98	6,89	F39	0,00	0,00
F20	0,00	0,00	F40			F20		0,00	F40	0,00	0,00
Ext. Sol.	16,62	6,26				Ext. Sol.	15,07	21,12			



Anexo 152. Análise filogenética de isolados bacterianos, baseado em sequências do gene ribossomal RNAr 16S. O dendograma apresenta a similaridade do micro-organismo CFA 06 com o *Bacillus safensis*. Análise realizada no CPQBA sobre a responsabilidade da Profa. Valéria de Oliveira Maia de Oliveira.



Anexo 153. Análise filogenética de isolados bacterianos, baseado em sequências do gene conservado gyrB. O micro-organismo CFA 06 apresentou 100% de similaridade com o *Bacillus safensis*. Análise realizada no CPQBA sobre a responsabilidade da Profa. Valéria de Oliveira Maia de Oliveira.

Thermo Proteome Discoverer 1.2.0.208

File Search Report Quantification Processing Workflow Editor Administration Tools Window Help

Administration amostra18.msf

Proteins	Peptides	Search Input	Result Filters	Peptide Confidence	Search Summary						
		Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Description	
		gi157680088	38.84 %	507	12	224	24.0	9.79	1906.84	hypothetical protein BPUM_0538 [Bacillus pumilus SAFR-032]	
		gi157679792	6.21 %	1	1	145	16.9	6.28	22.42	transcriptional regulator [Bacillus pumilus SAFR-032]	
		gi157680260	31.11 %	2	1	45	5.2	9.76	19.92	hypothetical protein BPUM_0717 [Bacillus pumilus SAFR-032]	
		gi157683125	14.45 %	2	1	173	20.4	8.88	13.10	hypothetical protein BPUM_3625 [Bacillus pumilus SAFR-032]	
		gi157681895	4.17 %	3	1	360	40.6	9.47	9.16	aminodeoxychorismate lyase [Bacillus pumilus SAFR-032]	
		gi157682761	5.73 %	1	1	454	48.7	7.77	4.84	MFS family major facilitator transporter [Bacillus pumilus SAFR-032]	
		gi167012077	11.21 %	1	1	223	23.1	5.22	2.86	RecName: Full=Deoxyribose-phosphate aldolase; Short=DERA; AltName: Full...	
		gi157679699	10.13 %	1	1	237	27.0	8.59	2.56	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [Bacillus pumilus SAFR-032]	
		gi157680621	5.70 %	1	1	386	44.9	9.85	2.35	possible competence protein [Bacillus pumilus SAFR-032]	
		gi157683194	10.34 %	1	1	203	23.9	6.65	2.31	possible TetR family transcriptional regulator [Bacillus pumilus SAFR-032]	
		gi157682321	34.88 %	1	1	86	9.9	4.41	0.00	hypothetical protein BPUM_2810 [Bacillus pumilus SAFR-032]	

Protein Identification Details

1 21 41 61 81 101 121 141 161 181 201 224

```

1 MKKWFIVLVS SLIFVIMLSS IPASAASPRH GAIVTQTEA KNSGISADIV LPKTATIRNG YADWYLGLS AVIESGISKT ASGYKVFVLS GSQCGSKYNN
101 SEYDSSIKDG ARVNKLINN GDTVSLYVN GILRYKQPIY KPSRLKMLDV VKGVHGVQDN GINSYSQASF SNVQLRANTS GSVYKQMDGS IKSSLRKNL
201 ESGAAAPKFT VISSVPLSTS LSAQ

```

Coverage: 38.84% Include Filtered Out Peptides

OK Help

Anexo 154. Resultado da busca, em banco de dados, da análise dos peptídeos obtidos a partir da fração proteica da ativa, *do Bacillus safensis*, apresentando uma proteína sem função conhecida.

Thermo Proteome Discoverer 1.2.0.208

File Search Report Quantification Processing Workflow Editor Administration Tools Window Help

Administration amostra2pumilus.ms# amostra2uniprot.ms# amostra2pumilus.ms#

Proteins	Peptides	Search Input	Result Filters	Peptide Confidence	Search Summary			
Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Description
gi157680432	53.77 %	1067	27	491	56.8	5.66	3075.05	catalase KatX2 [Bacillus pumilus SAFR-032]
gi157680897	53.40 %	162	26	470	49.5	5.03	481.63	dihydrolipoyl dehydrogenase [Bacillus pumilus SAFR-032]
gi157682780	15.55 %	81	7	566	61.9	5.59	251.37	acetolactate synthase [Bacillus pumilus SAFR-032]
gi166991514	19.22 %	88	7	515	56.3	5.38	226.74	RecName: Full=1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase; Short=P5C dehydro...
gi157680088	10.71 %	40	2	224	24.0	9.79	91.00	hypothetical protein BPUM_0538 [Bacillus pumilus SAFR-032]
gi166918817	7.63 %	26	6	944	106.8	5.62	80.85	RecName: Full=2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component; AltName: Full=...
gi157683065	16.74 %	22	6	478	54.6	5.44	46.54	beta-glucosidase [Bacillus pumilus SAFR-032]
gi157679771	5.64 %	7	3	887	101.2	5.29	19.75	alpha-mannosidase [Bacillus pumilus SAFR-032]

Protein Identification Details

1 51 101 151 201 251 301 351 401 451 491

1 11 21 31 41 51 61 71 81 91

```

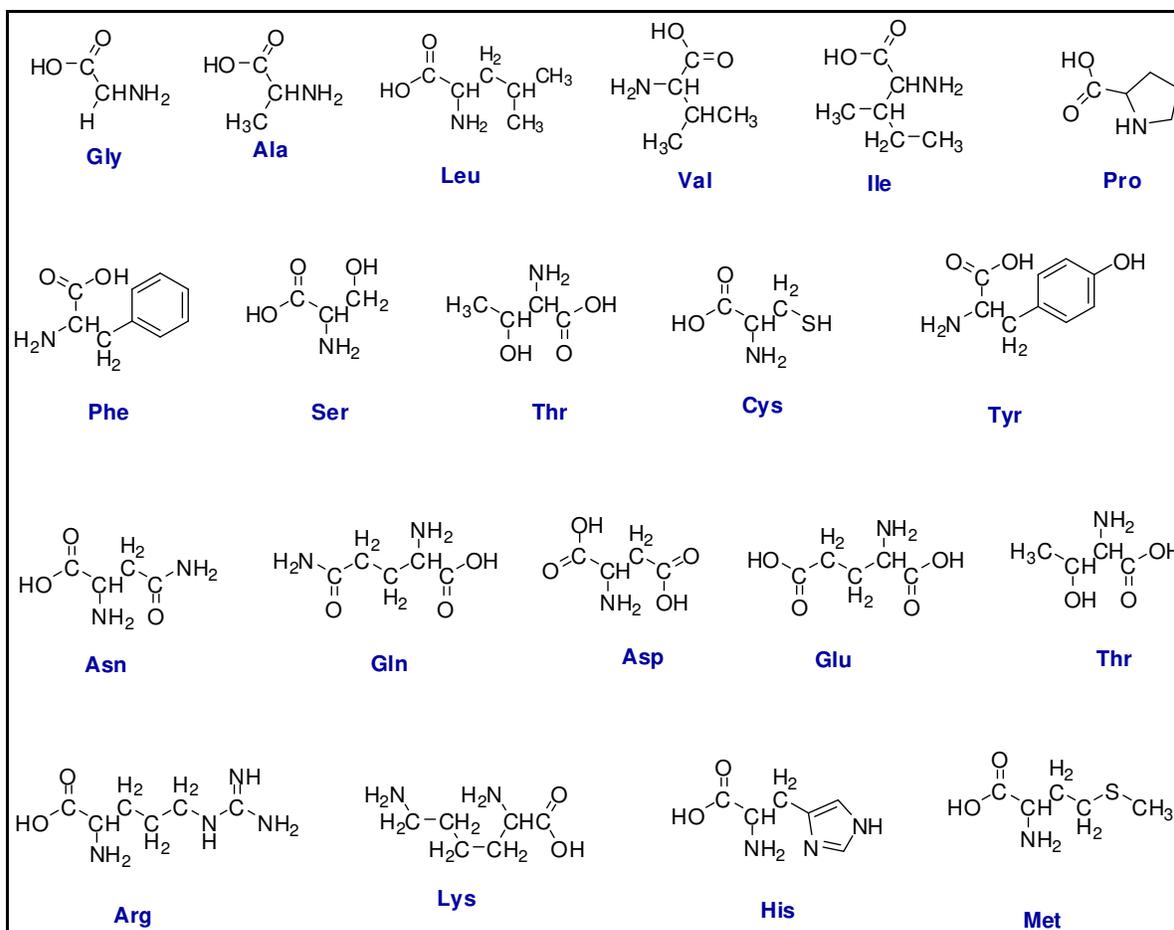
1 MINSNHRNLT TNQGVPPVGDN QNSRTACHRG PTFLLDYHLI EKLAFDRER IPERVVHARG AGAYGVVEVE NSMEKHTKAA FLSEDKQID VVVRFSSTVIH
101 PWSSEFILRD FRGFVAVKFTT EEGNYDLVGN NLFIFPIRDA LKFPDMVBSL KPDVVTNIQD PQRVWDFML TPESTRMLTW LFSDEGIPAN YAEHRGSSGVH
201 FERWVNYKGE TKVVKYHWRP SEGIRNLSME EAAEIQANDF QHATROLYDR IENGNYFAND LYVQLMPLSD YDDLVDVPCD FIKTWSEEDY PLQKVGRRML
301 NRNPFNFPAE TQSAFTPSA LVPGIEASD KLLQRLFSY PVTQRRLGA NVMRIPVNCV YAPVRRNQDQ GEMTTTRPSG HINYEPMRYD DQPKENPHYK
401 ESEQLHDDR MVRQKIEKPN DFKQAGEKTR SYSEEEKAL IRNLTADLRD VNDKTKLLAI CNFYRADEDY GQRLADSLGV DIRSYLQGNM K

```

Coverage: 53.77% Include Filtered Out Peptides

OK Help

Anexo 155. Resultado da busca, em banco de dados, de uma amostra do *flow through* da troca catiônica de *Bacillus safensis*, revelando uma catalase.



Anexo 156. Estruturas dos aminoácidos e seus respectivos símbolos.